

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE

Studijní program: biologie

Studijní obor: imunologie



Diplomová práce

**Role vybraných buněčných populací a molekul při zánětlivé a
odhojovací reakci**

**The role of selected cell populations and molecules in inflammatory
reaction and rejection of skin allograft**

Michaela Pavlíková

Školitelka: RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.

Praha 2012

Prohlašuji, že diplomovou práci jsem vypracovala samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Magdalény Krulové, Ph.D. a s pomocí citovaných literárních zdrojů. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného, nebo stejného akademického titulu.

Praha 2012

Michaela Pavlíková

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D., za odborné vedení při zpracování mé diplomové práce, ochotu a věnovaný čas. Moje díky patří také panu doc. RNDr. Vladimíru Holáňovi, DrSc., za odborné konzultace, Mgr. Elišce Svobodové a Lucii peřinové za všestrannou pomoc, dále RNDr. Aleně Zajícové, CSc., Lucii Holáňové, Jaroslavě Knížové a všem ostatním členům Laboratoře transplantační imunologie. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině, především mamince a Romanovi, za podporu nejen při psaní této práce, ale i během celého studia.

Abstrakt

Mezenchymální kmenové buňky (MSC) představují heterogenní populaci multipotentních kmenových buněk, které je možno izolovat z různých tkání dospělého organismu. Díky svým imunomodulačním, antiapoptotickým, cytoprotektivním a diferenciačním schopnostem tvoří velmi slibný prostředek pro léčbu mnoha zánětlivých onemocnění a v regenerativní medicíně.

Naším cílem bylo analyzovat terapeutický přínos MSC na modelu transplantace kožního štěpu. V experimentech jsme pro kultivaci a aplikaci MSC používali nanovláknenné nosiče. Myším kmene BALB/c byly transplantovány alogenní kožní štěpy kmene C57BL/6, které byly následně překryty nanovláknennými nosiči připravenými technologií elektrostatického zvlákňování z polymeru kyseliny mléčné (poly-L-lactic acid, PLA). Některá zvířata byla ponechána bez léčby, jiná byla léčena pomocí různých terapií kombinujících použití nanovláknenných nosičů s adherovanými MSC a nanovláknenných nosičů s inkorporovaným cyklosporinem A (CsA), nebo bez CsA. Abychom stanovili vliv MSC na imunitní odpověď, používali jsme různé metody zahrnující FACS analýzu, ELISA testy, PCR, imunohistochemické metody a Griessovu reakci.

Je známo, že MSC po aplikaci migrují přednostně do zánětlivých oblastí v poškozené tkáni a rovněž do lymfatických orgánů. V naší studii se podařilo prokázat, že šest dní po transplantaci a lokálním podání MSC je skutečně možné tyto kmenové buňky detekovat především v kožním transplantátu a dále také v lymfatických uzlinách a slezině. Naše výsledky ukazují, že MSC inhibují lokální zánětlivou reakci prostřednictvím snižování aktivity a funkcí makrofágů. Zjistili jsme, že vlivem různých terapií se mění zastoupení makrofágů v kožním transplantátu, jejich produkce oxidu dusnatého a dále profil exprese genů buněk štěpu. V závislosti na použité léčbě jsme také pozorovali změny v produkci interleukinu 10 a interferonu gama buňkami lymfatických uzlin a rovněž v relativním buněčném zastoupení různých populací leukocytů v lymfatických uzlinách.

Na základě těchto výsledků usuzujeme, že nanovláknna s inkorporovaným CsA a s adherovanými MSC představují vhodnou formu aplikace, která kombinuje výhody buněčné terapie s lokálním podáváním imunosupresivního léku. Tato léčba by mohla mít příznivý efekt na potlačení zánětlivé a odhojovací reakce následující po transplantaci

Klíčová slova: mezenchymální kmenové buňky (MSC), transplantace kožního štěpu, nanovláknenné nosiče

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSC) represent a heterogeneous population of multipotent stem cells that can be isolated from various tissues of adult organism. Due to their immunomodulatory, antiapoptotic, cytoprotective and differentiation capabilities, MSC hold a great promise for treatment of many inflammatory diseases and for use in regenerative medicine.

We aimed to analyze the therapeutic effect of MSC in a model of skin transplantation. In our research, nanofiber scaffolds were used for application of MSC. Allogeneic skin grafts were transplanted from C57BL/6 mice to BALB/c mice and they were subsequently covered with nanofiber scaffolds prepared from poly-L-lactic acid (PLA) by the original needleless electrospun Nanospider technology. Some animals remained untreated, others were treated by specific therapies that combined usage of nanofiber scaffolds with cultivated MSC and nanofiber scaffolds with or without incorporated cyclosporin A (CsA). We used various methods, including FACS analysis, ELISA, PCR, immunohistochemistry and Griess reaction to determine effect of MSC on immune response.

It has been reported that MSC home preferentially to sites of inflammation within damaged tissues and can be localised also in lymphatic organs. Six days after transplantation and local MSC application we detected MSC mainly in the skin graft and also in lymph nodes and spleen. According to our results MSC suppress both local and systemic immune inflammatory reactions. We found that specific therapies reduced number of macrophages in skin allograft, nitric oxide production and also altered the profile of gene expression of the cells in grafted tissue. Depending on the therapy, we also detected changes in distribution of leukocyte populations and in interleukin 10 and interferon gamma production by lymph node cells.

Based on these results, we conclude that CsA-loaded MSC-seeded nanofibres represent a suitable delivery system which combines advantages of cell-based therapy with local administration of immunosuppressive drug. This treatment has a beneficial effect on modulation of inflammatory reaction and could subsequently inhibit rejection of the allografts.

Keywords: mesenchymal stem cells, skin graft transplantation, nanofiber scaffold

Obsah

1	Seznam použitých zkratk	8
2	Úvod	10
3	Cíle diplomové práce	11
4	Literární přehled	12
4.1	Mezenchymální kmenové buňky	12
4.1.1	Popsání mezenchymálních kmenových buněk	12
4.1.2	Výskyt a úloha MSC v organismu	12
4.1.3	Izolace a kultivace MSC	13
4.1.4	Fenotyp MSC	13
4.1.4.1	Morfologie MSC	13
4.1.4.2	Povrchové znaky	14
4.1.4.3	Migrace a usidlování MSC v organismu	15
4.1.5	Postavení MSC v rámci imunitního systému	16
4.1.5.1	Imunoprivilegovanost	16
4.1.5.2	Imunomodulační vlastnosti MSC	17
4.1.5.3	Molekuly zapojené v imunomodulačním působení MSC	18
4.1.5.4	Vliv MSC na DC	19
4.1.5.5	Vliv MSC na T lymfocyty	20
4.1.5.6	Vliv MSC na B lymfocyty	22
4.1.5.7	Vliv MSC na NK buňky	22
4.1.5.8	Vliv MSC na makrofágy	23
4.1.5.9	Vliv MSC na neutrofile a eosinofily	23
4.1.6	Terapeutické využití imunomodulačních schopností MSC	23
4.1.6.1	Transplantace kožního štěpu a léčba kožních poranění	25
4.1.6.2	Nanovláknenné nosiče a jejich využití v terapii	27
4.1.6.3	Využití nanovláknenných nosičů společně s MSC při kožních poraněních	28
5	Materiál a metody	30
5.1	Zvířata	30
5.2	Pufry a media	30
5.3	Použitý software	30
5.4	Použitá technická vybavení	31
5.5	Izolace a kultivace MSC	32
5.6	Nanovláknenné nosiče a transplantace kožních štěpů	33
5.7	Značení MSC pomocí PKH 26	34

5.8	Řezy a jejich barvení	35
5.9	Izolace RNA a reverzní transkripce.....	35
5.10	PCR.....	37
5.11	ELISA	38
5.12	Měření produkce oxidu dusnatého (NO)	39
5.13	Proliferační test/test metabolické aktivity buněk.....	40
5.14	Průtoková cytometrie.....	40
5.15	Statistická analýza	43
6	Výsledky.....	44
6.1	Vliv nanovláknenných nosičů na MSC.....	44
6.2	Test migrace aplikovaných MSC	46
6.3	Kinetika odhojování kožních transplantátů.....	49
6.3.1	Průtoková cytometrie	49
6.3.2	Porovnání morfologie tkáně kožních štěpů	55
6.4	Analýza lokální imunitní odpovědi	60
6.4.1	Průtoková cytometrie	60
6.4.2	Expresí genů pro prozánětlivé cytokiny	63
6.4.3	Změny produkce NO makrofágy v kožním transplantátu vlivem terapie	64
6.5	Analýza systémové imunitní odpovědi.....	66
6.5.1	Průtoková cytometrie	66
6.5.2	Vliv jednotlivých variant terapie na produkci cytokinů buňkami lymfatických uzlin...70	
6.5.3	Detekce zánětlivých faktorů pomocí stimulace makrofágů.....	71
7	Diskuse.....	72
8	Závěr	80
9	Použitá literatura	81

1 Seznam použitých zkratek

APC	allophycocyanine, alofykocyanin
CD	cluster of differentiation, diferenciační antigen
Coll/PLLCL	collagen/poly(L-lactic acid)-co-poly(3-caprolactone), kolagen/kopolymer kyseliny mléčné s kaprolaktonem
ConA	concanavaline A, konkanavalin A
CsA	cyclosporin A, cyklosporin A
DC	dendritic cells, dendritické buňky
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FCS	fetal calf serum, fetální telecí sérum
FITC	fluorescein isothiocyanate, fluorescein isothiokyanát
Foxp3	forkhead box proteins 3
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza
GFP	green fluorescent protein, zelený fluorescenční protein
GVHD	graft versus host disease, reakce štěpu proti hostiteli
HGF	hepatocyte growth factor, růstový faktor hepatocytů
HLA	human leukocyte antigen, lidský leukocytární antigen
hMSC	human mesenchymal stem cells, lidské mezenchymální kmenové buňky
HSC	hematopoietic stem cells, hematopoetické kmenové buňky
ICAM	intercellular adhesive molecule, mezibuněčná adhezivní molekula
IDO	indoleamin 2,3 dioxygenáza
IFN	interferon
Ig	immunoglobulin, imunoglobulin
IGF	insulin-like growth factor, inzulinu podobný růstový faktor
IL	interleukin
iNOS	inducible nitric oxid synthase, indukovatelná syntáza oxidu dusného
LFA	leucocyte-function-associated antigen, adhezivní molekula leukocytů
LIF	leukemia inhibitory factor, leukemický inhibiční faktor
LNC	lymph node cells, buňky lymfatických uzlin
LPS	lipopolysaccharide, lipopolysacharid

mAb	monoclonal antibody, monoklonální protilátka
MHC	major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex
MLC	mixed lymphocyte reaction, směsná lymfocytární reakce
MSC	mesenchymal stem cells, mezenchymální kmenové buňky
NK	natural killers, přirození zabíječi
PA6/12	polyamid 6/12
PBS	phosphate buffered saline, fosfatový pufr
PBS/F	fosfátový pufr obohacený o FCS
PBS/T	fosfátový pufr obohacený o roztok Tween-20
PLA	poly-L-lactic acid, polymer L-kyseliny mléčné
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězcová reakce
PE	phycoerythrin, fykoerytrin
PGE2	prostaglandin E2
ROR γ t	retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t
SD	standard deviation, standardní odchylka
Spl	splenocyty
Tc	cytotoxic T cells, cytotoxické T lymfocyty
TGF	transforming growth factor, transformující růstový faktor
Th	helper T cells, pomocné T lymfocyty
TLR	toll like receptor
TNF	tumor necrosis factor, faktor nekrotizující nádory
Treg	regulatory T cells, regulační T lymfocyty
VCAM	vascular cell adhesion molecule, cévní adhezivní molekula
VEGF	vascular endothelial growth factor, cévní endoteliální růstový faktor
VLA	very late antigen, pozdní aktivační antigen
WST	water soluble tatrastolium, ve vodě rozpustná tetrazoliová sůl
wt %	weight percentage, váhová procenta

2 Úvod

Mezenchymální kmenové buňky (MSC, mesenchymal stem cells) jsou multipotentní kmenové buňky schopné v závislosti na diferenciačních a růstových faktorech diferenciaci a transdiferenciaci v různé buněčné typy všech tří zárodečných linií. Nachází se v mnoha tkáních plodu i dospělého organismu. Kromě těchto svých diferenciačních schopností disponují však také imunomodulačními vlastnostmi. Ukázalo se, že MSC mají schopnost specificky směřovat imunitní odpověď v protizánětlivou, brání apoptóze přeživších buněk, a napomáhají tak vytvořit regenerativní prostředí. Neméně důležitou vlastností MSC je jejich cílená migrace. Prostřednictvím prozánětlivých faktorů, chemokinů a jejich receptorů jsou MSC naváděny do míst poškozené tkáně. Další výhodou MSC je skutečnost, že jejich využití není, na rozdíl od embryonálních kmenových buněk, spojeno s etickými problémy, navíc získávání MSC není příliš složité. Nejčastěji se izolují z kostní dřeně, alternativním zdrojem může být tuková tkáň či placenta.

Vzhledem ke svým imunomodulačním, migračním a diferenciačním schopnostem jsou MSC slibným prostředkem při terapii zánětlivých onemocnění a v transplantační a regenerativní medicíně. V klinické praxi se využívají pro zvýšení úspěšnosti transplantace kostní dřeně, při prevenci reakce štěpu proti hostiteli či léčbě syndromu diabetické nohy. Do budoucna je uvažováno zavedení podpůrné léčby pomocí MSC také například u infarktu myokardu, u autoimunitních onemocnění, jako je roztroušená skleróza nebo revmatoidní artritida, a u diabetu. Velkým přínosem by MSC mohly být i při terapiích různých kožních poranění a u transplantací kůže.

Existuje několik způsobů podání MSC. Mezi nejpoužívanější patří intravenózní aplikace či injekční aplikace přímo do poraněné tkáně. Další možností by mohlo být podání MSC pomocí nanovláknenných nosičů. Zejména u kožních defektů představují nanomateriály velký léčebný potenciál nejen díky tomu, že je možné na nich úspěšně kultivovat a přenášet kmenové buňky, ale také proto, že kryjí poranění a vytváří mechanickou oporu a vhodné mikroprostředí prostředí pro reparaci poškozené tkáně. Terapie založená na využití nanovláknenných nosičů s adherovanými MSC v sobě skýtá mnoho výhod, protože kombinuje dostupnost a regenerativní potenciál léčby pomocí nanomateriálů, možnost inkorporovat do nanovláken léky, které se pak uvolňují pouze lokálně, a unikátní imunomodulační schopnosti MSC. Do budoucna by léčba pomocí nanovláknenných nosičů s adherovanými MSC mohla být novým prostředkem využívajícím buněčnou terapii v klinické praxi.

3 Cíle diplomové práce

V současnosti se po transplantacích kůže využívá konzervativní léčba pomocí imunosupresivní terapie, či dokonce transplantace kostní dřeně dárce společně s potřebnou tkání. Oba tyto přístupy jsou velice náročné, ne vždy účinné a v případě celkové imunosuprese navíc přináší pro pacienta rizika vyplývající z potlačení reakcí imunitního systému. Alternativu by mohla představovat léčba pomocí MSC, které mají schopnost potlačit aloreaktivní imunitní odpověď, nebo využití různých membrán či syntetických materiálů, které by zajistily mechanickou oporu a krytí rány. Jen několik studií se však zabývá kombinací těchto přístupů.

Cílem této práce je na myším modelu transplantace kůže otestovat terapeutický přínos MSC adherovaných na nanovláknenných nosičích. Předmětem studia je vliv MSC na imunitní reakce probíhající po transplantaci alogenního kožního štěpu, přičemž proběhne srovnání působení MSC podaných na nanovláknenných nosičích bez cyklosporinu A (CsA), nebo s inkorporovaným CsA. Snahou celého projektu je ovlivnit imunitní odpověď za účelem potlačení nežádoucí zánětlivé reakce a prodloužení přežívání štěpů.

4 Literární přehled

4.1 Mezenchymální kmenové buňky

4.1.1 Popsání mezenchymálních kmenových buněk

Existence nehematopoetických buněk v kostní dřeni byla postulována již před více než 130 lety německým patologem Juliem F. Cohnheimem, který sledoval reparaci tkáně fibroblastickými buňkami z kostí dřene (Cohnheim 1867).

Mezenchymální kmenové buňky (MSC, mesenchymal stem cells) byly poprvé popsány až v 70. letech 20. století Alexandrem J. Friedensteinem et al., kteří je charakterizovali jako populaci adherentních buněk izolovaných z kostní dřene, které se podobají fibroblastům a mají schopnost osteogeneze (Friedenstein et al. 1966). Název mezenchymální kmenové buňky ale získaly až v roce 1991, kdy je Arnold Caplan charakterizoval jako buňky podílející se na regeneraci mezenchymálních tkání (Caplan 1991).

V současnosti je známo, že MSC tvoří heterogenní populaci buněk s diferenciacními a imunomodulačními schopnostmi a lze je nalézt nejen v kostní dřeni, ale i v mnoha dalších tkáních organismu. V literatuře jsou také označovány jako stromální kmenové buňky, stromální buňky kostní dřene nebo kosterní kmenové buňky (Gronthos et al. 2003). Podle Mezinárodní společnosti pro buněčnou terapii by se však pro tyto buňky měl používat název multipotentní stromální kmenové buňky. Termín mezenchymální kmenové buňky by pak měl označovat populaci splňující specifická kritéria (viz. str. 14). Zkratka MSC se ale často užívá pro obě tyto skupiny.

4.1.2 Výskyt a úloha MSC v organismu

MSC se nachází v různých tkáních a orgánech dospělého organismu i plodu. Nejčastěji se však izolují z kostní dřene. Z této tkáně jich je možné získat nejvíce, a to přesto, že zde tvoří jen malou část buněk – asi 0,01–0,001% (Glennie et al. 2005). Úlohou MSC v kostní dřeni je vytvářet vhodné prostředí pro hematopoézu, nejen produkcí růstových faktorů, ale také díky svým diferenciacním schopnostem. Bylo dokázáno, že MSC jsou schopné diferencovat v endotelové buňky, myofibroblasty, pericyty, stromální buňky, osteocyty a osteoblasty –

tedy buňky tvořící niku hematopoetických kmenových buněk (HSC, hematopoietic stem cells) (Muguruma et al. 2006). O nice samotných MSC není mnoho známo. Zdá se, že na rozdíl od jiných kmenových buněk ani nemají svoji jedinečnou niku, zřejmě ji sdílí s jinými kmenovými buňkami nacházejícími se na různých místech organismu (Glennie et al. 2005).

Mezi další tkáně a orgány, ze kterých byly MSC úspěšně izolovány, patří tuková tkáň získaná liposukcí (Romanov et al. 2005), periferní krev (Reading et al. 2000), synoviální membrána (De Bari et al. 2001), kosterní sval (Williams et al. 1999) nebo zubní dřeň (Gronthos et al. 2000) či slzné žlázy (You et al. 2011). MSC se také podařilo získat z krve, kostní dřeně a jater plodu (Campagnoli et al. 2001). Lze je nalézt i v placentě a amniotické tekutině, přičemž v placentě se nachází jak plodové, tak mateřské MSC (in't Anker et al. 2004). Úlohou MSC ve všech těchto tkáních je zřejmě regenerace či oprava poškození vzniklého následkem poranění nebo po nemoci.

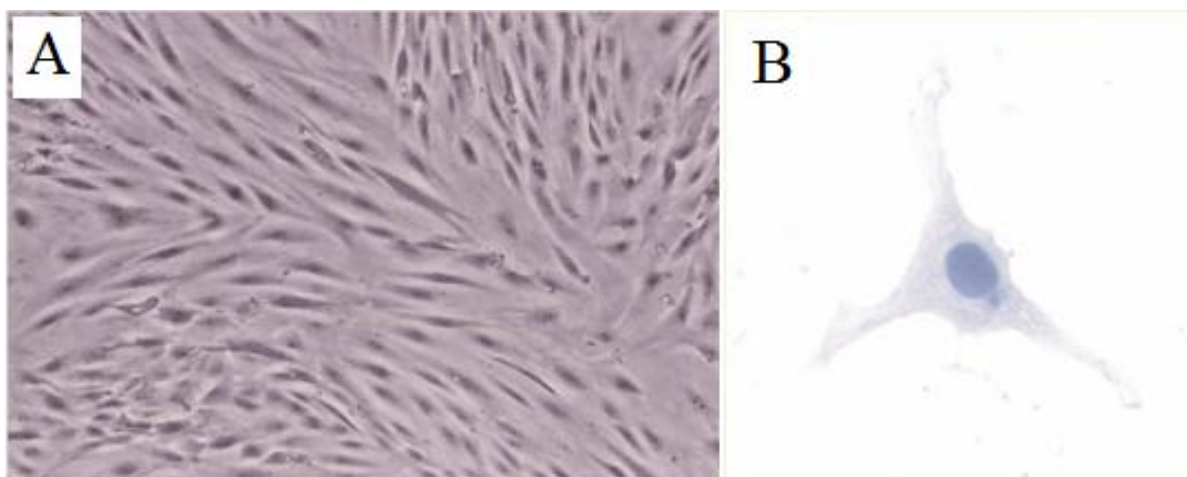
4.1.3 Izolace a kultivace MSC

Většina popsaných způsobů izolace a purifikace MSC je založena na jejich schopnosti adheze. Díky adhezenci MSC k povrchu kultivační nádoby je možné je snadno oddělit od ostatních méně adherentních buněk kostní dřeně nebo jiné tkáně a dále je kultivovat. Už po první pasáži se množí exponenciálně, a to až po 40 generací (Gronthos et al. 2003), ale pouze do 22–23 generace jsou tyto buňky schopny diferenciaci v osteoblasty, chondrocyty a adipocyty (Muraglia et al. 2000).

4.1.4 Fenotyp MSC

4.1.4.1 Morfologie MSC

MSC tvoří homogenní buněčnou linii. Jedná se o heterogenní populaci buněk, mezi které patří prekursorů fibroblastů, adipocytů, kostní dřeně a zárodečné endoteliální buňky kostní dřeně (Dominici et al. 2009). Muraglia et al. (2000) pozorovali, že v kultuře MSC adherovaných na plastu je možné rozlišit tři fenotypy. Nejpočetnější skupinu tvoří fibroblastické podlouhlé buňky (obr. 1), dále lze popsat velké zploštělé buňky a buňky malé s hvězdovitým tvarem.



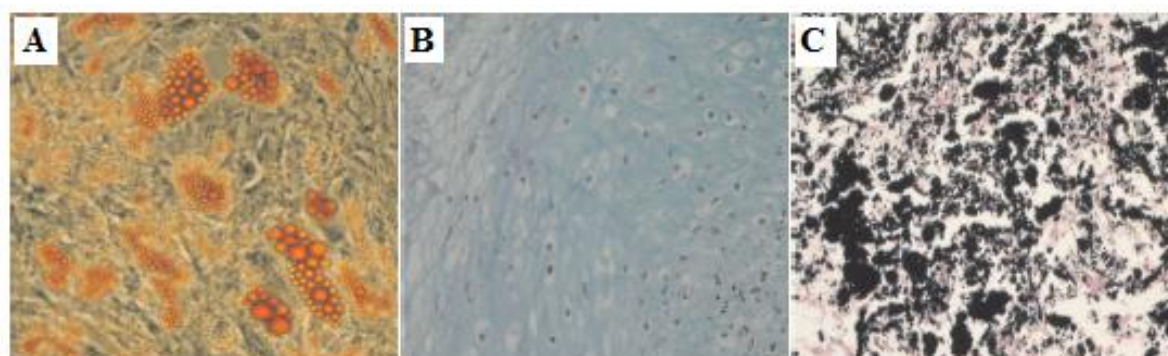
Obrázek 1. Morfologie mezenchymální kmenové buňky.

Obrázek 1. A znázorňuje třikrát pasážovanou populaci MSC adherovanou na plastu (převzato a upraveno z Romanov et al. (2005)). Na obrázku 1. B je vidět charakteristický vřetenovitý fibroblastický tvar MSC pěstovaných v kultuře. Jedná se o velké buňky s jádrem, výrazným jadérkem a granulární cytoplazmou (převzato a upraveno z Jones and McGonagle (2008)).

4.1.4.2 Povrchové znaky

V současnosti neexistuje znak, který by byl charakteristický pouze pro MSC. Mohou však mít marker, který je pro ně jedinečný v rámci určité tkáně. Pro charakteristiku MSC se tedy používá soubor negativních a pozitivních markerů společně s fenotypem a diferenciacími schopnostmi. Lidské mezenchymální kmenové buňky (human mesenchymal stem cells, hMSC) jsou podle Mezinárodní společnosti pro buněčnou terapii definovány třemi minimálními kritérii (Dominici et al. 2006).

- 1) MSC pěstované za standardních podmínek jsou adherentní.
- 2) MSC exprimují diferenciacími antigenů (CD, cluster of differentiation) CD105, CD73, CD90. Nenachází se u nich CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 a lidský leukocytární antigen –DR (HLA-DR, human leukocyte antigen-DR).
- 3) In vitro jsou MSC schopny ve vhodných podmínkách diferencovat v osteoblasty, chondroblasty a adipocyty (obr. 2).



Obrázek 2. Diferenční potenciál MSC.

Na obrázku 2. A je vidět adipogenní diferenciace MSC. Jsou zde dobře patrné oranžově zbarvené tukové vakuoly (obarveno pomocí Oil red O), obrázek 2. B ukazuje MSC po chondrogenní diferenciaci (obarveno pomocí Alcian green) a fotografie C znázorňuje osteogenní diferenciaci MSC, která je indikována ukládáním vápníku (barveno pomocí Silver nitrate) (převzato a upraveno z Le Blanc et al. (2003)).

MSC mají nízkou expresi antigenů hlavního histokompatibilního komplexu I třídy (MHC I, major histocompatibility complex I) a žádné MHC II třídy. Neexprimují ani kostimulační molekuly CD40, CD40L nebo CD86. Může u nich však být indukována exprese MHC II a Fas ligandu. Lidské MSC mají na svém povrchu také molekuly důležité při interakcích s T lymfocyty. Těmi je mezibuněčná adhezivní molekula-1 (ICAM-1, intracellular adhesive molecule-1), cévní adhezivní molekula-1 (VCAM, vascular cell adhesion molecule-1) a adhezivní molekula leukocytů-3 (LFA-3, leukocyte-function-associated antigen-3) (Jiang et al. 2005). MSC exprimují i další adhezivní molekuly a integriny, mezi které patří CD106, CD44, CD21, CD54 (Le Blanc et al. 2003).

Na závěr této kapitoly je nutné podotknout, že v rámci různých živočišných druhů se mohou MSC expresí svých povrchových znaků částečně lišit. Schopnost adherovat k povrchu a potenciál diferencovat v osteoblasty, chondroblasty a adipocyty jsou však společnými znaky pro všechny MSC.

4.1.4.3 Migrace a usidlování MSC v organismu

Je známo, že MSC mohou v organismu migrovat, například z kostní dřeně recirkulují pod vlivem různých faktorů nebo následkem poranění (Jones et al. 2008). Poznání mechanismů jejich migrace je velice důležité pro úspěšnou aplikaci MSC při léčbě různých onemocnění. Nejčastěji používanou technikou je intravenózní podání MSC, kde se využívá jejich schopnosti

prostoupit cévní stěnou do tkáně (Ruster et al. 2006). Některé pokusy ukazují, že MSC dokážou překonat i hemato-encefalickou bariéru. Zappia et al. (2005) ve svých experimentech aplikovali do krevního oběhu pokusného zvířete MSC exprimující zelený fluorescenční protein (GFP, green fluorescent protein). Po několika dnech bylo možné tyto buňky pozorovat v mozku.

Po systémové aplikaci lze MSC detekovat v různých tkáních, jako jsou lymfatické uzliny, slezina nebo plíce. Přednostně však migrují do místa poranění. Bylo zjištěno, že lidské i myší MSC exprimují malé množství chemokinových receptorů CCR6, CCR9, CXCR3 a CXCR6, které pomáhají navádět MSC k zánětlivým oblastem (Chamberlain et al. 2008). MSC na svém povrchu téměř neexprimují L-selektiny ani E-selektiny, které jsou důležité pro adhezi leukocytů. Pro navázání MSC jsou důležité molekuly P-selektinu na endotelových buňkách a integrinu VCAM-1, který se váže ke svému receptoru, pozdnímu aktivačnímu antigenu-4 (VLA-4, very late activation molecule) na MSC (Ruster et al. 2006). Při prostupu cévní stěnou a následně tkáněmi se uplatňují matrixové metaloproteinázy (Son et al. 2006). Podáním MSC do blízkosti poškozené tkáně je možné jejich migraci a usídlení výrazně urychlit (Kassis et al. 2008).

4.1.5 Postavení MSC v rámci imunitního systému

4.1.5.1 Imunoprivilegovanost

Mezi znaky MSC patří malá povrchová exprese MHC I molekul a absence MHC II molekul. Vlivem zánětlivé reakce se ale exprese obou molekul MHC zvyšuje. Tohoto jevu lze docílit i kultivací MSC při nízké koncentraci interferonu- γ (IFN- γ) (Stagg et al. 2006). Další zajímavou funkcí IFN- γ je indukce exprese Fas ligandu na MSC. Právě nízký počet MHC molekul a možnost exprese Fas ligandu spolu s absencí receptorů CD80/CD86 jsou důvodem imunoprivilegovanosti MSC. V důsledku toho pak nejsou transplantované MSC rozpoznávány T-buňkami a nedochází k jejich odstranění (Aggarwal and Pittenger 2005). Nízká exprese MHC I molekul by na druhou stranu mohla vést k napadání MSC přirozenými zabíječi (NK, natural killers). Na základě pokusů s čerstvě izolovanými NK buňkami se však ukázalo, že k zabíjení MSC může dojít až po aktivaci NK buněk interleukinem 15 (IL-15) nebo IL-2 (Sotiropoulou et al. 2006). Tu et al. (2010) upozornili na fakt, že dalším mechanismem pro potlačení hyperakutní rejekce alogenních MSC může být inhibice aktivace komplementu.

4.1.5.2 Imunomodulační vlastnosti MSC

MSC napomáhají regeneraci tkání diferenciací a transdiferenciací v různé buněčné typy. Ukazuje se však, že mnohem větší přínos mají díky svým imunomodulačním schopnostem. MSC sekretují mnoho faktorů a působí i přímým mezibuněčným kontaktem, čímž výrazně ovlivňují mikroprostředí poranění, vykazují antiapoptotické a cytoprotektivní účinky, interagují s buňkami imunitního systému a napomáhají tak utlumení zánětu a regeneraci tkáně. MSC působí na přirozenou i adaptivní imunitu. Potlačují proliferaci a funkci T lymfocytů, ovlivňují B lymfocyty, neutrofile, eozinofily, makrofágy, NK buňky i dendritické buňky (DC, dendritic cell) (obr. 3). V důsledku provázanosti interakcí mezi buňkami imunitního systému mohou MSC působením na jeden typ buněk změnit efektorové vlastnosti jiných imunitních buněk.

Imunomodulační schopnosti MSC nejsou během celé doby jejich kultivace stejné. Liu et al. (2012) ukázali, že se vzrůstajícím počtem pasáží nejprve rostou imunosupresivní vlastnosti MSC, avšak od desáté pasáže se tato jejich imunosupresivní schopnost zmenšuje a zároveň rostou imunogenní vlastnosti MSC. Z toho vyplývá důležitost kontroly počtu dělení a pasáží MSC, které se pak dále využívají v imunologických studiích.

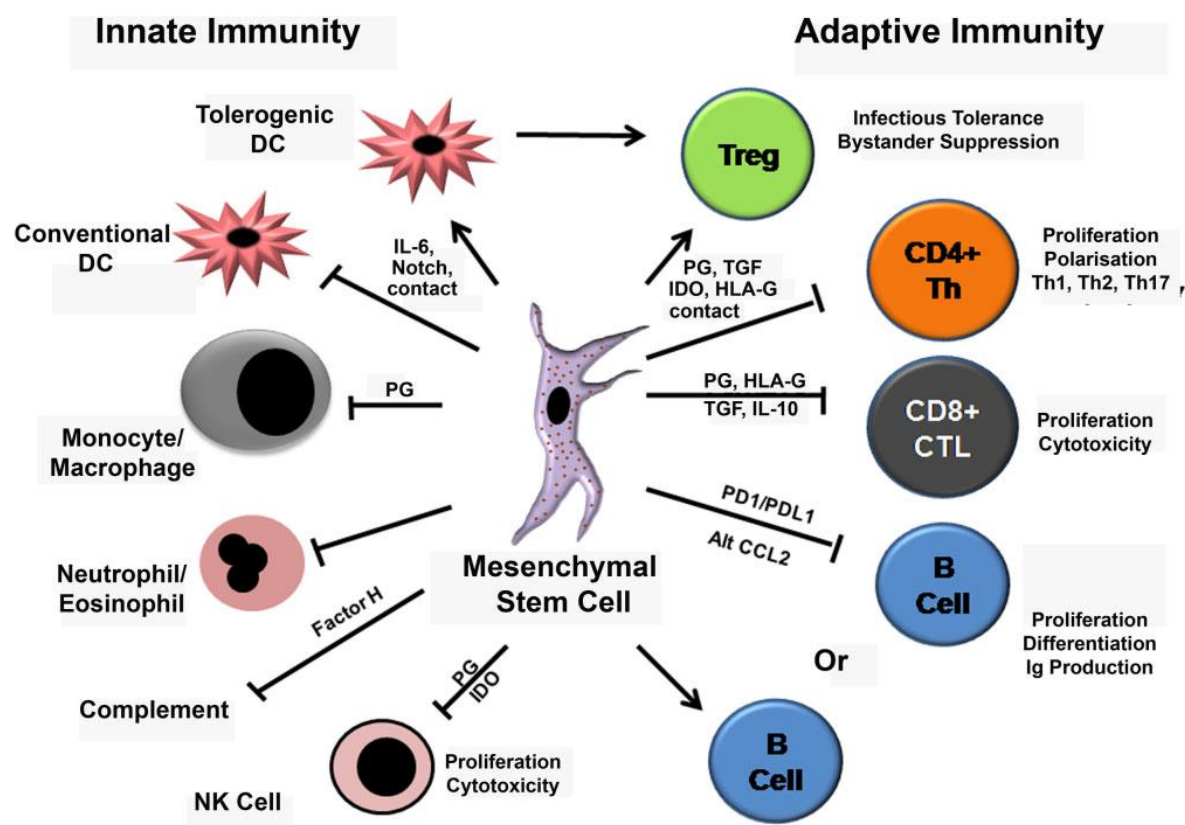
Migrace, diferenciaci a imunomodulační schopnosti MSC mohou být ovlivněny i prostřednictvím působení ligandů toll-like receptorů (TLR), nebo působením cytokinů na MSC. Waterman et al. (2010) postulovali hypotézu, že stejně jako je možné rozdělit makrofágy na dva typy – prozánětlivé a protizánětlivé –, můžeme i u MSC rozlišit dvě populace. Pokud se MSC vystaví krátkému působení agonisty TLR4, dojde k jejich polarizaci na prozánětlivý fenotyp označovaný jako MSC1, naopak vystavení působení agonisty TLR3 vede k polarizaci na imunosupresivní fenotyp MSC2. Na základě těchto znalostí byl vytvořen model, který předpokládá, že k aktivaci opravných a imunosupresivních vlastností MSC2 dojde v případě zánětu, který doprovází výskyt endogenních intracelulárních molekul uvolněných z poškozených buněk (English and Mahon 2011; Ghannam et al. 2010). Pokud je zánět asociován s infekcí bakteriemi a jsou přítomné toxiny či lipopolysacharid, dojde k preferenční stimulaci MSC1 fenotypu důležitého při regulaci akutní imunitní odpovědi na poranění. Aktivuje se přirozená imunita a následně i imunita adaptivní. Až po této fázi může dojít k postupné polarizaci MSC na imunosupresivní fenotyp MSC2, který napomáhá regeneraci poškozené tkáně (Waterman et al. 2010).

4.1.5.3 Molekuly zapojené v imunomodulačním působení MSC

Kromě přímého mezibuněčného kontaktu jsou pro imunomodulační schopnosti MSC nezbytné i rozpustné molekuly. To bylo prokázáno srovnáváním působení MSC při kokultivaci buněk a v systému, kde byly jednotlivé populace buněk odděleny propustným membránovým filtrem. Zároveň však bylo zjištěno, že vliv na imunitní buňky je větší v případě, kdy dochází k přímému mezibuněčnému kontaktu s MSC (Jiang et al. 2005; Spaggiari et al. 2006). Velkou výhodou solubilních molekul je možnost působení na větší vzdálenost. To potvrdili Liu et al. (2011) ve svých pokusech, kdy zjistili, že MSC podané v difuzní komůrce do břišní oblasti pokusné myši snižují vznik otoku indukovaného pomocí vpichu alogenních leukocytů do nohy tohoto pokusného zvířete.

K solubilním molekulám odpovědným za imunomodulační schopnosti MSC patří transformující růstový faktor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$, transforming growth factor $\beta 1$), růstový faktor hepatocytů (HGF, hepatocyte growth factor), NO produkovaný indukovatelnou syntázou oxidu dusnatého (iNOS, inducible nitric oxide synthase) a u lidí také lidský leukocytový antigen G5 (HLA-G5, human leukocyte antigen-G5) (Di Nicola et al. 2002; Liu et al. 2012). Dále se také uplatňuje IL-10, leukemický inhibiční faktor (LIF), prostaglandin E2 (PGE2), indoleamin 2,3 dioxygenáza (IDO) a mpCCL2, antagonist chemokinu CCL2 důležitého pro chemotaxi prozánětlivých buněk. MSC v přítomnosti IFN- γ secernují CCL2 a zároveň také specifické metaloproteinázy, které štěpí N-konec tohoto chemokinu (Aggarwal and Pittenger 2005; Krampera et al. 2006; Rafei et al. 2009; Rafei et al. 2008; Selmani et al. 2008).

Ren et al. (2008) zjistili, že produkce rozpustných molekul se u MSC může měnit vlivem prostředí, ve kterém se nachází. Působení prozánětlivých cytokinů, jako jsou IFN γ , TNF α nebo IL-1, může paradoxně zvýšit imunosupresivní vlastnosti MSC. Účinné přitom byly kombinace cytokinů IFN γ s TNF α , nebo IFN γ s IL-1. Po přidání těchto cytokinů k buněčné kultuře se zvýšila exprese genů pro iNOS a následně produkce NO mezenchymálními kmenovými buňkami. Zároveň se prozánětlivými cytokiny také indukuje exprese chemokinů, které atrahují aktivované T i B lymfocyty, DC i makrofágy k MSC. Tím, že se buňky imunitního systému dostanou do blízkosti MSC, se zvýší imunosupresivní efekt lokálně působících molekul, jako je NO. Dále bylo prokázáno, že vlivem prozánětlivých cytokinů se mění exprese genů a následná produkce IL-6 a naopak po působení protizánětlivých cytokinů vzrůstá produkce TGF- β (Svobodová et al. 2012).



Obrázek 3. Komplexnost působení MSC na buňky imunitního systému.

MSC modulují jak vrozenou, tak adaptivní imunitní odpověď. Na buňky imunitního systému působí přímým buněčným kontaktem a rozpustnými faktory jako je HLA-G, PGE2, IDO, TGF- β , IL-6, IL-10 a chemokin mpCCL2 nebo faktor H. MSC mění i expresi povrchových molekul odpovědných za buněčnou smrt, jako jsou FAS receptory nebo ligandy programované smrti (PDL1, programmed death ligand 1). Jak je vidět na tomto schématu, působení MSC je většinou inhibiční, směřující imunitu k protizánětlivé tolerantní odpovědi na antigeny. Některé imunitní buňky mohou být ovlivněny i zprostředkovaně. Tím, že MSC působí na pomocné T lymfocyty (Th, helper T cells) buňky, ovlivňují i B lymfocyty a analogicky působením na DC je ovlivněn i vznik regulačních T buněk (Treg) (převzato a upraveno podle English a Mahon (2011)).

4.1.5.4 Vliv MSC na DC

MSC mohou potlačovat vývoj DC z monocytů, jejich maturaci, funkci, zpracování antigenu, migraci do lymfatických uzlin a mění produkci cytokinů DC. U DC dochází po kontaktu s MSC k zastavení buněčného cyklu ve fázi G0/G1. Tento proces je vratný (Jiang et al. 2005; Ramasamy et al. 2007a). Důležitou roli hraje i inhibice exprese genů pro kostimulační molekuly CD40, CD80, CD83, CD86 a HLA-DR a změna produkce cytokinů DC. Jiang et al.

(2005) pozorovali snížení produkce IL-12 DC, které byly v kontaktu s MSC. Dále bylo zjištěno, že myeloidní DC produkují méně TNF- α a plasmacytoidní DC naopak zvýší produkci IL-10. MSC také mění zpracování proteinů DC, čímž dokážou ovlivnit prezentaci antigenů na MHC I a MHC II a tím i aktivaci CD4 a CD8 pozitivních T lymfocytů. Dalším důležitým poznatkem je, že MSC inhibují migraci DC do uzlin (Chiesa et al. 2011). MSC ovlivňují DC přímým buněčným kontaktem i solubilními faktory, jako je PGE2. Tento vliv je však mnohem menší než působení přímého buněčného kontaktu (Aggarwal and Pittenger 2005).

4.1.5.5 Vliv MSC na T lymfocyty

MSC působí na paměťové i naivní T buňky, ovlivňují Th buňky i cytotoxické lymfocyty (Tc, cytotoxic T cells), regulují rovnováhu mezi Th17 a Treg buňkami i mezi Th1 a Th2 lymfocyty. V případě transplantace kostní dřeně MSC migrují do thymu a podílí se tam na pozitivní selekci T lymfocytů (Krampera et al. 2006; Krampera et al. 2003). MSC potlačují proliferaci T lymfocytů aktivovaných antigeny, mitogeny nebo ve směsné lymfocytární kultuře (mixed lymphocyte culture, MLC) (Glennie et al. 2005). Podobně je tomu u Tc lymfocytů. Ukazuje se, že MSC působí především na vznik a proliferaci těchto cytotoxických buněk, ale už nemají vliv na aktivované buňky (Rasmusson et al. 2003).

Glennie et al. (2005) zjistili, že hlavním inhibičním mechanismem MSC je nevratné zastavení buněčného cyklu T lymfocytů ve fázi G0/G1, aktivace a produkce IFN γ je inhibována také, ale po odebrání MSC z kultury se obnoví. Ukazuje se, že inhibice T lymfocytů MSC je zprostředkována mezibuněčným kontaktem i rozpustnými faktory a není závislá na MHC (Krampera et al. 2003). Mezi solubilní molekuly produkované MSC působící na T lymfocyty patří NO syntetizovaný iNOS (Di Nicola et al. 2002), PGE2 (Aggarwal and Pittenger 2005), HLA-G5 (Selmani et al. 2008), IDO (Krampera et al. 2006) a mpCCL2 (Rafei et al. 2009).

Vliv MSC na Th1 a Th2 lymfocyty a jejich rovnováhu

Následkem interakce s MSC se mění aktivita Th buněk. MSC působí na snížení efektorových funkcí Th1 lymfocytů, které pak produkují méně IFN- γ a zároveň podporují funkce Th2 lymfocytů, u nichž se zvýší produkce IL-4 a IL-10. MSC ale nepůsobí na T lymfocyty jen přímo, významné je i ovlivnění naivních buněk prostřednictvím DC. Maturované DC totiž

pod vlivem MSC mění spektrum produkovaných cytokinů a kostimulačních molekul. Takto ovlivněné DC pak působí na diferenciaci a aktivitu Th2 buněk a naopak potlačují diferenciaci a funkce Th1 buněk. MSC tímto způsobem mohou měnit rovnováhu mezi Th1 a Th2 buněčnou imunitní odpovědí a směřovat tak imunitní odpověď organismu na protizánětlivou (Aggarwal and Pittenger 2005, Glennie et al. 2005, Svobodová et al. 2012).

Vliv MSC na Treg a Th17 lymfocyty a jejich rovnováhu

MSC mají schopnost ovlivnit diferenciaci stimulovaných T lymfocytů na Treg i Th17 buňky. Vývoj Treg může být navozen několika mechanismy. Treg vznikají po kontaktu s nematurovanými DC, jejichž počet se působením MSC zvyšuje (Maccario et al. 2005), nebo u lidí působením HLA-G5 (Selmani et al. 2008). MSC jsou významnými producenty TGF- β a IL-6, přičemž TGF- β zřejmě podporuje diferenciaci Treg a Th17 buněk a výsledná diferenciaci závisí na množství TGF- β a přítomnosti dalších cytokinů (Svobodová et al. 2012). Vysoké koncentrace TGF- β v nediferencovaných T lymfocytech potlačují expresi genů pro IL-23 a podporují diferenciaci na Treg lymfocyty. V přítomnosti menších koncentrací TGF- β společně s IL-6, IL-21 a IL-23 je podporována diferenciaci naivních CD4⁺ lymfocytů v Th17 buňky (Zhou et al. 2008). V tomto procesu se uplatňuje i IL-1 β a TNF- α . Rafei et al. (2009) ve svých experimentech ukázali, že MSC mohou diferenciaci Th17 a Th1 lymfocytů ovlivnit ještě další molekulou – mpCCL2. Odpovědi T lymfocytů na tento chemokin je zřejmě aktivace fosfatáz, které diferenciaci v Th17 a Th1 inhibují.

MSC ale nepůsobí jen na diferenciaci těchto dvou druhů T lymfocytů, ovlivňují i efektorové funkce už diferencovaných lymfocytů. U Treg se vlivem MSC zvyšuje produkce IL-10 (Maccario et al. 2005). Ghannam et al. (2010) ve svých experimentech zjistili, že MSC inhibují produkci prozánětlivých cytokinů IL-17, IL-22, IFN- γ a TNF- α Th17 buňkami. U Th17 buněk byla navíc byla po kontaktu s MSC zjištěna indukce exprese transkripčního faktoru Treg lymfocytů - Foxp3 - a produkce IL-10. Tyto výsledky ukazují na skutečnost, že MSC mohou napomáhat přeměně Th17 na Treg buňky. V tomto ději je zřejmě zapojen TNF- α , na který MSC odpovídají zvýšenou produkcí PGE2.

Na závěr této podkapitoly je třeba ještě zmínit skutečnost, že MSC izolované z kostní dřeně plodu mohou inhibovat diferenciaci Th1 lymfocytů, oproti předchozím modelům ale mají schopnost podpořit vývoj Th17 lymfocytů (Guo et al. 2009).

4.1.5.6 Vliv MSC na B lymfocyty

Vlivem MSC se u B lymfocytů mění proliferační schopnosti, produkce imunoglobulinů (Ig) i jejich migrační schopnosti. Podobně jako u T lymfocytů je i u B buněk hlavním mechanismem inhibice zastavení buněčného cyklu ve fázi G0/G1 (Corcione et al. 2006). Při pokusech v systému buněčných populací oddělených propustnou membránou bylo zjištěno, že pro plnou inhibici B buněk sice stačí rozpustné molekuly produkované MSC, avšak pro jejich produkci je nutné parakrinní ovlivnění MSC B lymfocyty. Dále byla také po kontaktu těchto dvou populací detekována ztráta schopnosti B lymfocytů přeměnit se v plazmatické buňky a snížená produkce IgM, IgG a IgA (Asari et al. 2009). V tomto procesu se uplatňuje stejná molekula, která je zapojena v supresi T buněk, a to sice upravený chemokin mpCCL2. Odpovědí na jeho působení je změna buněčné signalizace, která vede k inhibici syntézy imunoglobulinů (Rafei et al. 2008). MSC působí na funkci B lymfocytů také tím, že mění zastoupení jejich povrchových molekul a receptorů. MSC neovlivňují schopnosti B lymfocytů prezentovat antigen, ale prostřednictvím snížení exprese genů pro chemokinové receptory CXCR4, CXCR5 a CCR7 je potlačena schopnost B lymfocytů usidlovat se v sekundárních lymfatických orgánech. Rozpustnými faktory, uplatňujícími se v působení na B buňky, jsou TGF- β 1, HGF, PGE2 a IDO (Corcione et al. 2006).

4.1.5.7 Vliv MSC na NK buňky

MSC působí na aktivaci NK buněk, jejich proliferaci, cytotoxicitu i produkci cytokinů. Inhibiční efekt MSC je založen na snižování počtu aktivačních povrchových receptorů na NK buňkách a na snížení produkce IFN- γ NK buňkami (Selmani et al. 2008). Ukázalo se také, že mnohem větší vliv mají MSC na klidové než na aktivované NK buňky (Spaggiari et al. 2006) a že pro potlačení cytotoxicity NK buněk je nutný přímý kontakt s MSC. Výsledky jednotlivých experimentů však velice záleží na podmínkách. Čerstvě izolované NK buňky si i v přítomnosti MSC zachovávají schopnost zabíjet buňky bez MHC I třídy (Sotiropoulou et al. 2006). Mezi rozpustné faktory podílející se na vlivu MSC na NK buňky patří PGE2, TGF- β , IDO a HLA-G5 (Spaggiari et al. 2006).

4.1.5.8 Vliv MSC na makrofágy

Většina starších prací popisuje především vliv MSC na T a B lymfocyty, na DC a NK buňky. Nově se však ukazuje, že nezanedbatelné je i působení na monocyty a makrofágy. MSC působí na expresi povrchových molekul i na produkci cytokinů makrofágy. Lze říci, že makrofágy vlivem působení MSC mění svůj profil z prozánětlivých buněk na regulační (Ohtaki et al. 2008). Po třech dnech kokultivace MSC s makrofágy se u makrofágů zvýší exprese znaku charakteristického pro protizánětlivý typ těchto buněk – CD206 (Kim and Hematti 2009). MSC působí na makrofágy především mezibuněčným kontaktem a indukují u nich zvýšenou schopnost fagocytózy apoptotických buněk v místě zánětu, čímž napomáhají reparaci tkáně a mírní rozvoj zánětlivé reakce. Zároveň také inhibují produkci cytokinů TNF- α , IL-6, IL-12 a IFN- γ a stimulují produkci IL-10 makrofágy. Zajímavé je, že k tomuto efektu stačí i supernatanty z kultury nestimulovaných MSC. Ze solubilních molekul působících na makrofágy je zřejmě nejdůležitější PGE2 (Maggini et al. 2010).

4.1.5.9 Vliv MSC na neutrofile a eosinofile

Stejně jako makrofágům byla i těmito dvěma populacím leukocytů věnována pozornost až v poslední době, kdy se zjistilo, že MSC působí na některé funkce neutrofilů i eosinofilů.

Raffaghello et al. (2008) ve své práci ukázal, že MSC působí na klidové i aktivované neutrofile, u kterých inhibují apoptózu a oxidativní vzplanutí, přičemž není ovlivněna fagocytóza a chemotaxe. Hlavní molekulou zodpovědnou za tento efekt je IL-6.

Kavanagh a Mahon (2011) při svých výzkumech vlivu MSC v terapii alergií zjistili, že po podání MSC se sníží výskyt eosinofilů v zánětlivých ložiscích v plicích a tím se zmírní rozvoj alergických projevů.

4.1.6 Terapeutické využití imunomodulačních schopností MSC

Prvotní výzkumy využití MSC se týkaly zejména využití jejich diferenciačních a transdiferenciačních vlastností. V poslední době však velkého významu nabývá možnost prostřednictvím MSC modulovat imunitní odpověď. Spolu se schopností MSC migrovat do míst poranění a ochránit nepoškozené buňky před apoptózou pak představuje využití těchto kmenových buněk slibný prostředek pro léčbu mnoha onemocnění a při transplantacích.

Schopnost MSC měnit rovnováhu mezi prozánětlivými populacemi lymfocytů Th1, Th17 a mezi protizánětlivými populacemi lymfocytů Th2, Treg a směřovat tak buňky imunitního systému na tolerantní, protizánětlivou odpověď na antigeny, lze využít pro léčbu autoimunitních onemocnění, jako je například diabetes mellitus (Urban et al. 2008), revmatoidní artritida (Mao et al. 2010) nebo roztroušená sklerosa (Zappia et al. 2005). Úspěšné experimenty byly provedeny také při terapii akutního selhání ledvin (Imberti et al. 2007), infarktu myokardu (Uemura et al. 2006) nebo poranění plic (Ortiz et al. 2007). Uplatnění nachází MSC i při kotransplantaci s HSC (Almeida-Porada et al. 2000) a při dalších orgánových transplantacích, jako je transplantace jater (Wan et al. 2008), ledvin (Zhang et al. 2007), srdce (Wu et al. 2003) či transplantace kožního štěpu (Sbano et al. 2008). MSC byly úspěšně využity i v případě prevence akutní reakce štěpu proti hostiteli (GVHD, graft versus host disease) (Aksu et al. 2008; Le Blanc et al. 2004) nebo při léčbě závažného onemocnění osteogenesis imperfecta (Horwitz et al. 2001).

Vzhledem k tomu, že za určitých podmínek mohou být MSC mírně imunogenní (viz kapitola 4.1.5.1), jeví se jako bezpečnější varianta použití autologních buněk. U akutních případů však lze využít i alogenní MSC. Kim et al. (2009) ve svých pokusech léčby kožního poranění u králíků ukázali, že není terapeutický rozdíl mezi autologními a alogenními MSC. Další velkou výhodou těchto kmenových buněk je skutečnost, že autologní MSC lze používat i u pacientů s autoimunitními chorobami, jako je například roztroušená skleróza, protože jejich imunomodulační vlastnosti a schopnost podporovat hematopoezu zůstává neovlivněna (Papadaki et al. 2005).

Pro ještě lepší využití MSC v klinické praxi lze tyto kmenové buňky různě ovlivnit či geneticky manipulovat tak, aby měly požadované vlastnosti. Jak již bylo řečeno, jednou z možností je působení cytokinů a jiných molekul na MSC v kultuře a jejich aktivování a nasměrování v protizánětlivé působení (Svobodová et al. 2012). Další možností je zvýšení vitality MSC kultivací v hypoxických podmínkách (Uemura et al. 2006), nebo dokonce úprava těchto buněk pomocí metod genového inženýrství (Xia et al. 2011; Xu et al. 2007).

Zároveň je také třeba upozornit na rizika spojená s používáním MSC v klinice. Některé studie totiž poukazují na možnost, že MSC mohou za určitých podmínek migrovat do nádoru, podporovat jejich růst, bránit apoptóze nádorových buněk a vytvářet jim vhodnou niku. In vitro vykazovaly MSC přechodný vliv na potlačení proliferace nádorových buněk (Ramasamy et al. 2007b). Na druhou stranu to, že MSC migrují do nádorové tkáně, lze s výhodou využít při genové terapii. Xia et al. (2011) provedli úspěšné pokusy s MSC

transfekovanými adenovirovým onkolytickým vektorem. MSC tak posloužily jako doprava pro virové částice, které napomáhaly zástavě růstu a ničení nádorové tkáně.

Jelikož se v praktické části své diplomové práce věnuji využití MSC a nanovláknenných nosičů u myšího modelu transplantace kožního štěpu, jsou této tématice dále věnovány dvě samostatné kapitoly, včetně podkapitoly týkající se přímo využití nanovláknenných nosičů společně s aplikací kmenových buněk při kožních poraněních.

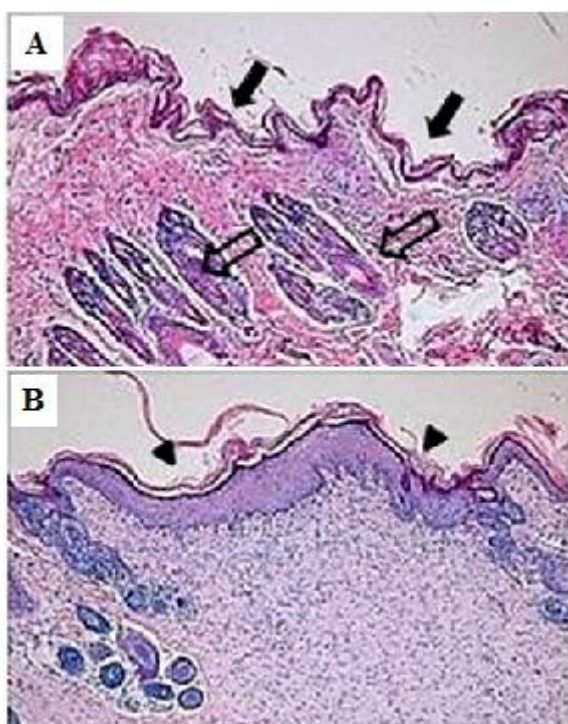
4.1.6.1 Transplantace kožního štěpu a léčba kožních poranění

Je velice obtížné zabránit odhojení dárcovského štěpu způsobenému aloreaktivními buňkami imunitního systému. Obzvláště pak u kůže, protože se jedná o jednu z nejvíce antigenních částí těla. Nejběžnějším způsobem navození a udržování přežití štěpu je podávání celkové imunosuprese. Ta je však mnohdy částečně toxická i pro buňky příjemce a navíc oslabuje obranyschopnost pacientů. Méně využívaným způsobem je transplantace kostní dřeně dárce současně s transplantací požadované tkáně nebo orgánu. Při léčbě různých kožních poranění existuje mnoho terapeutických postupů využívajících také různé kožní náhrady, jako jsou prasečí xenotransplantáty, syntetické membrány, kultivovaná dermis a epidermis či amniová membrána (Sheridan and Tompkins 1999). Alternativou by mohla být léčba pomocí MSC, které mají schopnost potlačit aloreaktivní imunitní odpověď (Bartholomew et al. 2002; Sbano et al. 2008), případně použití amniové membrány pokryté MSC (Kim et al. 2009) či aplikace MSC na syntetických nosičích buněk (Chong et al. 2007).

MSC mají schopnost diferencovat se na buňky kůže, jako jsou keratinocyty, endoteliální buňky, pericyty či monocyty, a napomáhat tak regeneraci poškozené tkáně (Sasaki et al. 2008). Hlavním mechanismem jejich účinku však zřejmě jsou jejich antiapoptotické, antiproliferativní vlastnosti. Bartholomew et al. (2008) zjistili, že významné je i načasování podání MSC. V případě intravenózní aplikace MSC současně s transplantací kožního štěpu bylo pozorováno výraznější potlačení proliferace T lymfocytů než při aplikaci několik dní od transplantace. Sbano et al. (2008) poukázali na fakt, že podání samotných MSC může rejekci transplantátu dokonce urychlit. Tomu lze zabránit současnou léčbou příjemce pomocí imunosuprese. Při současném podání MSC a CsA byla doba přežití kožního štěpu delší než u krys léčených pouze CsA. Rozborem exprese genů pro cytokiny v místě transplantace se zjistilo, že při aplikaci MSC a CsA se sníží produkce IFN- γ , IL-2 a TNF- α . Aksu et al. (2008) ve svých experimentech ukázali, že pro prevenci odhojení

vaskularizovaného kožního štěpu může být výhodné i podání MSC společně s buňkami kostní dřeně dárce (BMC, bone marrow cells). MSC v tomto modelu navíc zabránily rozvoji GVHD a napomáhaly usídlení a přijetí dárcovských BMC.

Menší kožní poranění je možné léčit i jinak než přímo transplantací kožního štěpu. Jedním z nejnovějších experimentálních postupů je aplikace MSC intravenózně současně s podáním amniové membrány nebo na amniové membráně. Bylo zjištěno, že účinnější je podání MSC adherovaných na amniové membráně (obr. 4). Využití amniové membrány umožňuje snazší aplikaci a zacílení MSC. Zároveň bylo zjištěno, že při využití amniové membrány se urychlí regenerační procesy v poškozené kůži (Kim et al. 2009).



Obrázek 4. Srovnání dvou léčebných variant využívajících amniovou membránu.

Na obrázku 4. A je vidět řez kůží v místě poranění u zvířete, kterému byly MSC podány na amniové membráně. Černé šipky znázorňují tenkou epidermis, bílé pak regeneraci kožních derivátů.

Obrázek 4. B ukazuje řez kůží v místě poranění u zvířete, které bylo léčeno podáním amniové membrány současně s intravenózní aplikací MSC.

Černé šipky znázorňují ztenčení epidermis oproti předchozímu případu. Byla pozorována proliferace fibroblastů a jen částečná regenerace kožních derivátů. A i B barveno hematoxilinem a eosinem, zvětšení 100x (převazato a upraveno z Kim et al. (2009)).

Podobně jako na amniové membráně lze MSC aplikovat na jiných nosičích, v poslední době se jako perspektivní jeví nanovláknenné materiály. Jejich výhodou oproti membráně je lepší dostupnost, nízká imunogenita, to, že nehrozí nebezpečí vzniku nádoru vlivem aplikace nanovláknenných nosičů, a v neposlední řadě není jejich využití svázáno s etickými problémy.

4.1.6.2 Nanovláknenné nosiče a jejich využití v terapii

Nanotechnologie je rychle se rozvíjející oblastí zahrnující obory jako biochemie, molekulární biologie, fyzikální chemie, mikroskopie, výpočetní technika a tkáňové inženýrství. Aplikace nanomateriálů je v současnosti považována za velmi slibný prostředek pro regenerativní medicínu. Mezi nanomateriály patří i již zmíněná nanovláknna, která lze charakterizovat jako textilní vlákna tenčí než 1 μm . Nanovláknna je možné vyrábět buď ze syntetických polymerů (polyamid, polyvinylalkohol, SiO_2), nebo z organických polymerů (celulóza, kolagen). Existuje také několik způsobů jejich výroby, a to templátová syntéza, fázová separace indukovaná teplotou, samouspořádání a elektrospining (Kumbar et al. 2008).

Nejpoužívanější metodou je elektrospining (čili elektrostatické zvlákňování), který umožňuje získat je možné získat nanomateriál o velké ploše povrchu, vysoké definované porozitě, s vlákny o velikosti několika desítek až stovek nanometrů. Principem této metody je tvorba vláken s využitím elektrostatického pole. Nabíтый roztok polymeru je z jedné elektrody tažen do vláken a směřován na protilehlou elektrodu s kolektorem. V závislosti na druhu kolektoru lze získat buďto náhodně uspořádaná nanovláknna, tubulárně, nebo příčně uspořádaná nanovláknna. Vlastnosti výsledného materiálu lze dále ovlivnit hustotou polymeru, jeho molekulární hmotností, druhem rozpouštědla, ve kterém se polymer nachází, vloženým napětím, teplotou, tlakem a vlhkostí (Reneker and Chun 1996; Zeng et al. 2003). Změnou různých parametrů a kombinací několika polymerů pak lze vytvořit nanovláknna specifická pro použití při léčbě poškození cév či nervové soustavy, při ireverzibilních poškozeních svalů a kostí, nebo při kožních poraněních (Kumbar et al. 2008).

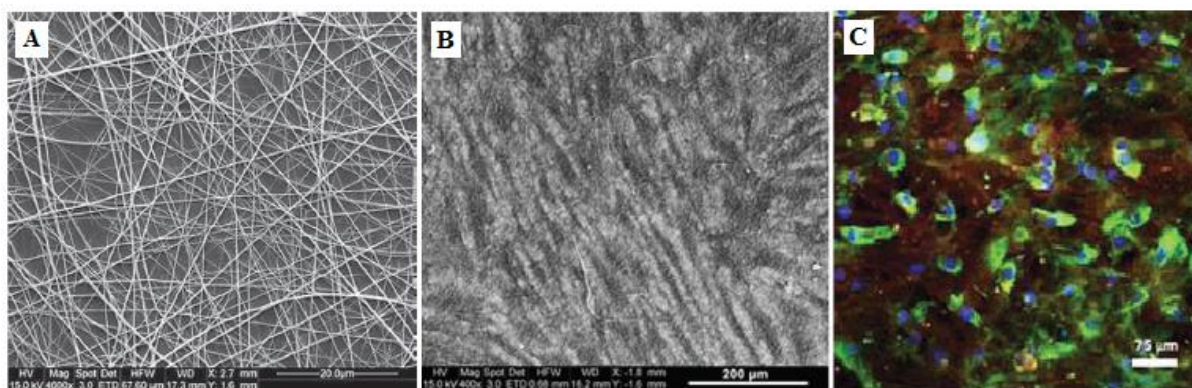
Nanovláknna je možné používat samotná, v tom případě chrání poranění a tvoří vhodné prostředí pro obnovu tkáně (Dubsky et al. 2012). Velice výhodné je však také využití nanovláken v kombinaci s inkorporovanými terapeutickými molekulami. Velkou předností nanovláken je jejich schopnost uvolňovat léčiva postupně, možnost zacílení terapeutik, která by se jinak musela podávat systemicky a v mnohem větších dávkách, a tím i snížení toxického vlivu těchto molekul na organismus. Během elektrospiningu lze do nanovláken enkapsulovat antibiotika, růstové faktory, plazmidovou DNA, vitamíny, imunosupresiva i chemoterapeutika (Chew et al. 2006). Xu et al. (2008) provedli úspěšné pokusy s inkorporací a následným uvolňováním doxorubicin hydrochloridu, lékem užívaném v protinádorové terapii. Holář et al. (2011) zjistili, že CsA inkorporovaný do nanovláknenných nosičů se uvolňuje po dobu několika dnů. Zpracování směsi polymeru a tohoto imunosupresiva nemá vliv na jeho farmakologickou účinnost.

Nanovláknenné nosiče jsou také výhodné pro pěstování a následnou aplikaci buněk. Využívá se přitom morfologické podobnosti vytvořených nanovláken s extracelulární matrix. Nanovláknna mimikují přirozené trojrozměrné mikroprostředí tkání, poskytují buňkám dostatek signálů pro přežívání, adhezi a proliferaci. Ozawa et al. (2002) ukázali, že nanovláknno s adherovanými svalovými buňkami může tvořit vhodné lešení, které zajistí elasticitu a udržení struktury svalu, dokud se kompletně neobnoví poškozená tkáň. Chemické složení nanovláken spolu se specifickou strukturou může také napomáhat cílené diferenciaci MSC. Rim et al. (2009) ukázali, že kombinací polymeru s želatinou vznikne nanovláknno vhodné pro adhezi a osteogenní diferenciaci MSC.

Na nanovláknenných nosičích se mohou kultivovat i kmenové buňky. Ukazuje se, že tento postup je pro jejich pěstování a následný přenos a zacílení dokonce mnohem výhodnější než běžná kultivace na plastiku. Struktura nanovláken navíc napodobuje jejich niku a tím podporuje proliferaci a sebeobnovu buněk (Nur-E-Kamal et al. 2006). Zajicova et al. (2010) ukázali, že na nanovláknenném nosiči je možné kultivovat a aplikovat MSC nebo limbální kmenové buňky při léčbě poškozeného povrchu oka u myši.

4.1.6.3 Využití nanovláknenných nosičů společně s MSC při kožních poraněních

Nanovláknenné nosiče mohou po přiložení na kožní poranění sloužit jako krytí a ochrana otevřené rány a napomáhat tak regenerativním procesům (Dubský et al. 2012). Navíc je lze osadit buňkami a podpořit tak reepitelizaci a revaskularizaci poškozené oblasti (Chong et al. 2007). Jin et al. (2011) se zabývali tvorbou nanovláknenných nosičů, které mimikují funkčně i strukturně morfologii kůže. Na svých nanovláknnech složených z kolagenu a kopolymeru kyseliny mléčné s kaprolaktonem (Coll/PLLCL, Collagen/poly(L-lactic acid)-co-poly(3-caprolactone)) byli schopni kultivovat MSC a podpořit jejich diferenciaci v epidermální buněčné typy. Po patnáctidenní kultivaci MSC na těchto nanovláknnech v mediu podporujícím epidermální diferenciaci pozorovali vysoký výskyt diferencovaných buněk obarvených pomocí protilátky proti keratinu 10 (epidermálnímu markeru) (obr. 5).



Obrázek 5. Kultivace MSC na nanovláknenných nosičích Coll/PLLCL.

Na obrázku 5. A je vidět struktura Coll/PLLCL nanovláknna, obrázek 5. B znázorňuje nediferencované MSC kultivované na nanovláknenném nosiči (oba obrázky byly získány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu). Na obrázku 5. C je obrázek z konfokálního mikroskopu. Jsou zde vidět MSC kultivované na nanovláknenném nosiči Coll/PLLCL po dobu 15 dnů. Vykazují fibroblastický fenotyp a je možné je obarvit protilátkou proti keratinu 10 (zelená) i protilátkou proti markeru MSC CD 105 (červená), jádra jsou obarvaná pomocí DAPI (modrá) (převzato a upraveno podle Jin et al. (2011)).

Dubský et al. (2012) ve svých experimentech využívali dva druhy nanovláknenných nosičů. Zjistili, že zatímco nanovláknna vyrobená z poly- ϵ -kaprolaktonu nemají žádný efekt na léčbu kožního poranění, želatinová nanovláknna signifikantně napomáhají reepitelizaci a celkové regeneraci poškozené tkáně. Skupina zároveň potvrdila, že na těchto nanovláknenných nosičích je možné úspěšně kultivovat jak fibroblasty, tak keratinocyty a MSC.

5 Materiál a metody

5.1 Zvířata

Při pokusech byly použity myši imbredních kmenů BALB/c nebo C57BL/6 (B6) ve věku 2–4 měsíce. Používali se samci i samice chované za standardních podmínek ve zvěřincích Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky (ÚMG AV ČR).

5.2 Pufry a media

MSC byly kultivovány v mediu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Toto medium bylo obohaceno o tepelně inaktivované fetální telecí sérum (fetal calf serum, FCS), (Sigma-Aldrich) do výsledné koncentrace 5 % nebo 10 %. Dále byl přidán penicilin (100 U/ml, Sigma-Aldrich), streptomycin (100 µg/ml, Sigma-Aldrich), 2-merkapt ethanol (5 x 10⁻⁵ M, Serva, Heidelberg, Germany) a HEPES pufr (10 mM, Sigma-Aldrich). Toto výsledné medium je dále označováno jako kompletní medium DMEM. Při jednotlivých pokusech byly všechny buňky kultivovány v mediu RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), obohaceném o FCS (5 % nebo 10 %), penicilin (100 U/ML), streptomycin (100 µg/ml), 2-merkapt ethanol (5 x 10⁻⁵ M) a HEPES pufr (10 mM). Toto medium je dále označováno jako kompletní medium RPMI 1640.

Při imunohistochemických barveních a přípravě buněk na FACS analýzu byl používán fosfátový pufr (phosphate buffered saline, PBS) připravovaný servisní laboratoří v ÚMG AV ČR (0,2 g KCl, 8 g NaCl, 0,24 g KH₂PO₄ a 1,44 g Na₂HPO₄, 1l destilované vody, pH upraveno na 7,2).

5.3 Použitý software

Ovládací software pro průtokový cytometr FACSDiva Software (BD, Franklin Lakes, NJ)

Vyhodnocovací software pro data získaná na průtokovém cytometru GateLogic308.3A (Inivai, Mentone Victoria, Australia)

Software pro práci s obrázky z mikroskopů ImageJ 1.42q (Wayne Rasband, Bethesda, MA)

Ovládací software pro invertovaný mikroskop Olympus Olympus soft Imaging Solutions

(Olympus, Munster, Germany)

Ovládací software pro ELISA reader (spektrofotometr) Revelation Quicklink (Dynex Technologies, Chantilly, VA)

Ovládací software pro transiluminátor elektroforetických gelů Scion Image (Scion Corporation, Howston, TX)

5.4 Použité technické vybavení

- Centrifuga Hettich Universal 32R (DJB Labcare, Buckinghamshire, England)
- Centrifuga 5430 (Eppendorf, Říčany u Prahy, Česká republika)
- Cycler PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc., St. Bruno, Canada)
- Elektroforetická aparatura: PowerPac 300 (BioRad), Hoefer HE33 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NY)
- Inkubátor (Sanyo, Osaka, Japan)
- Invertovaný mikroskop Olympus IX81, vybavený kamerou Hamamatsu ORCA C4742-80-12AG (Olympus, Praha, Česká republika)
- Laminární box CleanAir (Scholler instruments s.r.o., Praha, Česká republika)
- Magnetická ohřevová míchačka RCTbasic (IKA, Staufen, Germany)
- Minicentrifuga MiniSpin (Eppendorf)
- MyCyclerTM Thermal Cycler (BioRad, Hercules, CA)
- Optický mikroskop (Carl Zeiss, Praha, Česká republika)
- pH-metr pH526 (WTW, Praha, Česká republika)
- Průtokový cytometr LSR II (BD)
- Spektrofotometr Beckman DU 530 (Beckman Coulter, Fullerton, CA)
- Spektrofotometr OpsysMR (Dynex)
- Transiluminátor Electronic U.V. Transilluminator (Ultra Lum, Inc., Claremont, CA)
- Vodní lázeň TE-10D Tempunit (Techne, Minneapolis, MN)
- Vortex MS1 Minishaker (IKA)
- Vyhřívaná třepačka Thermomixer comfort (Eppendorf)
- Zmrazovací mikrotom Leica CM3050 S (Leica Microsystems, Nussloch, Germany)

5.5 Izolace a kultivace MSC

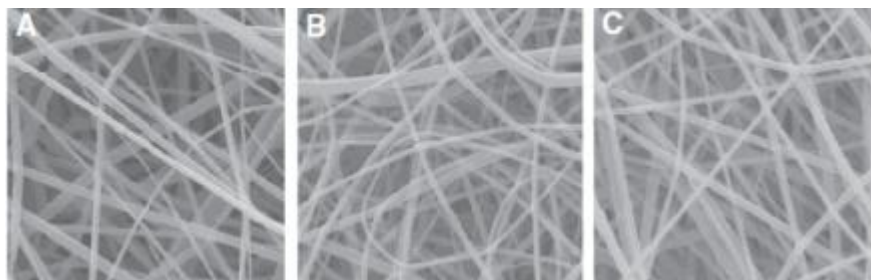
MSC byly získávány ze dvou typů tkání, z kostní dřeně a z tukové tkáně. MSC z kostní dřeně byly získány výplachem stehenních a holenních kostí myši kmene BALB/c kompletním médiem RPMI 1640 s 5% FCS za sterilních podmínek. Získaná tkáň byla zhomogenizována, filtrována přes sterilní nylonovou gázu a centrifugována (8 min, 170g). Buňky byly následně resuspendovány v kompletním médiu DMEM s 10% FCS. Následná kultivace buněk probíhala v lahvích pro tkáňové kultury (50 ml, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) v objemu 12 ml, při teplotě 37°C a v 5% CO₂ atmosféře v inkubátoru. Za účelem odstranění neadherentních buněk byl proveden 48 hodin po izolaci oplach kultury kompletním předeřátým médiem DMEM s 10% FCS.

Dále byly k izolaci MSC použity abdominální tříselné tukové kapsy. Tuková tkáň byla po odběru štěpena 1% kolagenázou I (Sigma-Aldrich) po dobu jedné hodiny v inkubátoru. Suspenze buněk byla přenesena do zkumavky, doplněna 7 ml PBS a centrifugována (8 min, 170 g). Za sterilních podmínek byl ze zkumavky odebrán PBS tak, aby na dně zkumavky zbyla peleta buněk a 1 ml roztoku. Buňky byly přeneseny do nové zkumavky a resuspendovány v 7 ml PBS. Po centrifugaci byl ze zkumavky odebrán PBS tak, aby na dně zkumavky zbyla peleta buněk a 1 ml roztoku. Buňky byly resuspendovány, přeneseny do nové zkumavky, bylo k nim přidáno 7 ml kompletního média DMEM s 10% FCS a suspenze buněk byla centrifugována. Tento předcházející krok byl zopakován ještě jednou. Následně byla peleta buněk resuspendována v 1 ml kompletního média DMEM s 10% FCS a přenesena do kultivační lahve a v celkovém objemu 12 ml kompletního média DMEM s 10% FCS byly buňky kultivovány stejně jako MSC získané z kostní dřeně. Při izolaci tukových MSC nebyla nutná purifikace buněk od myeloidních a lymfoidních prekurzorů.

Adherentní buňky byly následně kultivovány, pasážovány a po 3 týdnech, což odpovídá 3–5 pasážím, byly MSC použity v pokusech. Všem pokusům předcházelo srovnání působení MSC získaných z kostní dřeně a tukové tkáně. Nebyl zjištěn významný rozdíl v účinku ani migraci MSC izolovaných z těchto dvou zdrojů buněk.

5.6 Nanovláknenné nosiče a transplantace kožních štěpů

Nanovláknenné nosiče pro kultivaci a transport buněk byly získány ve spolupráci s firmou Elmarco, s. r. o., a s ÚMG AV ČR. K přípravě nanovláken byl využíván polymer kyseliny mléčné (PLA, Poly-L-lactic acid) a polyamid 6/12 (PA6/12). Některé nanovláknenné nosiče byly vyrobeny pouze z tohoto polymeru a do některých byl při výrobě inkorporován CsA v množství 10 váhových % (wt%, weight percentage) (obr. 6). Nanovláknena byla v laboratoři transplantační imunologie nastříhána na dílky o velikosti 1,5 x 1,5 cm, upevněna do napínacích kroužků CellCrownTM24 (Scaffdex, Tampere, Finland). Takto připravené kroužky se z obou stran sterilizovaly pomocí UV záření. Nanovláknena napnutá v kroužcích byla promyta kompletním médiem RPMI 1640 a umístěna do 24jamkové kultivační destičky (Nunc, Roskilde, Denmark). Do každé jamky s nanovláknenným nosičem bylo přidáno 650 μ l kompletního média RPMI 1640 s 10% FCS a následně bylo přidáno $0,5 \times 10^6$ MSC. Po 24 hodinové inkubaci byla nanovláknena připravená pro aplikaci při transplantaci kožního štěpu.



Obrázek 6. Morfologická charakterizace nanovláknenných nosičů s inkorporovaným CsA.

Na obrázku ze skenovacího elektronového mikroskopu jsou vidět nanovláknenné nosiče z PLA s inkorporovaným CsA (A – 0 wt% CsA, B – 1 wt%CsA, C – 10 wt%CsA). Inkorporací CsA do nanovláknenných nosičů se nezmění morfologie nanovláken ani farmakologická účinnost imunosupresiva. Dále bylo zjištěno, že CsA se z nanovláken v závislosti na parametrech uvolňuje po dobu několika dní. Zvětšeno 5000x. (Převzato a upraveno podle Holář et al., 2011).

Myši kmene BALB/c byl na dorzální část těla transplantován alogenní kožní štěp o velikosti 8 mm x 8 mm z ocasu dárce myšního kmene C57BL/6 podle techniky popsané v Billingham et al. (1954). Myši byly rozděleny do několika skupin, některým byla pouze transplantována kůže, dalším byl transplantát překryt nanovláknennými nosiči (bez CsA, nebo s inkorporovaným CsA) a některým byly na transplantát přiloženy nanovláknenné nosiče s adhezaními MSC (i zde byly dvě varianty nanovláken – buď bez CsA, nebo

s inkorporovaným CsA). Pro některé pokusy byly MSC adherované na nanovláknenných nosičích předem obarveny fluorescenční barvou PKH26.

Standardní doba odhojení kožního alotransplantátu u použití této kmenové kombinace myši je 10 až 12 dní. Pro základní analýzu kinetiky odhojování byly vzorky odebírány v různých časových intervalech od 2 do 10 dní po transplantaci, pro detailnější studium pak byl vybrán šestý den po transplantaci.

5.7 Značení MSC pomocí PKH 26

Jak již bylo popsáno v teoretickém přehledu, MSC mají schopnost migrovat nejen do míst poranění, ale i do lymfatických a jiných tkání. Aby bylo možné tuto migraci sledovat, byly MSC před aplikací na nanovláknenných nosičích obarveny červenou fluorescenční barvou PKH26. Jedná se o barvu, která se váže do lipidových oblastí buněčné membrány. Poločas rozpadu PKH26 je více než sto dní. Barvení bylo provedeno s využitím kitu Red Fluorescence Cell Linker Kit (Sigma-Aldrich) a probíhalo v následujících krocích:

- 1) Uvolnění adherovaných buněk roztokem EDTA.
- 2) Pro odstranění séra z media promítí PBS nebo bezsérovým médiem, centrifugace (2 x 8 minut, 170 g).
- 3) Odsátí supernatantu.
- 4) Přidání 1 ml diluentu C, resuspendování buněk.
- 5) Smíchání 1 ml roztoku buněk a 1 ml 4×10^{-6} M roztoku barviva PHK26 v diluentu C, promíchání pipetou, inkubace ve tmě (2–5 minut), průběžné promíchávání.
- 6) Zastavení barvení pomocí 2 ml FCS, inkubace (1 minuta).
- 7) Naředění roztoku kompletním médiem RPMI 1640, centrifugace (8 minut, 170 g).
- 8) Odsátí supernatantu, přepipetování pelety buněk do nové zkumavky.
- 9) Promytí buněk v 10 ml kompletního media RPMI 1640 (opakovat dvakrát pro odmytí nenavázané barvy).
- 10) Resuspendování buněk v kompletním médiu RPMI 1640 na koncentraci 2×10^6 /ml.

5.8 Řezy a jejich barvení

Orgány a tkáně pro přípravu histologických řezů byly odebrány do PBS. Odebírány byly kožní transplantáty a jejich bezprostřední okolí, dále lymfatické uzliny a sleziny. Vzorky byly následně zality do zamrazovacího media Tissue-Tek O. C. T. Compound (Sakura, Tokyo, Japan), zmrazeny na -21°C a nařezány na kryostatu na sérii řezů o tloušťce $6\text{ }\mu\text{m}$.

V pokusech, kde byla sledována migrace předem nabarvených MSC (pomocí fluorescenční barvy PKH26), byly řezy získané zpracováním tkáně na kryostatu pouze montovány do mowiolu 4-88 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) s přidaným modrým fluorescenčním barvivem DAPI ($0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$, Invitrogen, Praha, Česká republika), kterým se zvýraznila jádra buněk. Preparáty byly následně překryty krycím sklíčkem a skladovány ve tmě při teplotě -20°C .

Pro analýzu morfologie štěpů byly používány kožní transplantáty odebírané v různých časových intervalech. Tkáň byla zpracována pomocí kryostatu a získané řezy byly barveny hematoxilinem (hematoxylin Harrisův, Sigma-Aldrich) a eosinem ($0,2\text{ g}$, $200\text{ ml H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich). Dále byl použit roztok kyseleného alkoholu ($200\text{ ml } 80\text{ }\%$ ethanol (Lachema, Brno, Česká republika), 4 ml HCl), roztok NaHCO_3 ($200\text{ ml H}_2\text{O}$, $0,4\text{ ml NaHCO}_3$). Barvení probíhalo podle následujícího postupu:

- 1) Hematoxilin (3 minuty).
- 2) Oplach vodou.
- 3) Kyselý alkohol (ponořit a hned vytáhnout).
- 4) Oplach vodou.
- 5) NaHCO_3 (ponořit a vytáhnout).
- 6) Eosin (3 minuty).
- 7) Oplach destilovanou vodou, sušení na vzduchu.
- 8) Montování vzorků do glycerinu (Lachema), překrytí krycím sklíčkem.

5.9 Izolace RNA a reverzní transkripce

Kožní štěpy určené pro izolaci ribonukleové kyseliny (RNA, ribonucleic acid) byly ihned po odebrání zmrazeny a až do doby zpracování uchovávány při teplotě -70°C . Izolace RNA z kožních štěpů byla prováděna pomocí kitu NucleoSpin[®]RNAII (Macherey Nagel, Duren, Germany) podle postupu doporučeného výrobcem:

- 1) Homogenizace vzorku.
- 2) Přidání 350 μ l pufru RA1 + 3,5 μ l 2-merkaptoethanolu (Serva).
- 3) Filtrace buněčného lyzátu, centrifugace (1 minuta, 11 000 g).
- 4) Přidání 350 μ l 70% ethanolu, promíchání pipetou.
- 5) Filtrace buněčného lyzátu, centrifugace (30 sekund, 11 000 g).
- 6) Přidání 350 μ l roztoku Membrane Desalting Buffer, centrifugace (1 minuta, 11 000 g).
- 7) Přidání 95 μ l reakční směsi (10 μ l rDNase + 90 μ l Reaction Buffer for r DNase) na modrý filtr, inkubace (15 minut, 20 °C).
- 8) Promývání filtru 200 μ l pufru RA2, centrifugace (30 sekund, 11 000 g).
- 9) Promývání filtru 600 μ l pufru RA3, centrifugace (30 sekund, 11 000 g).
- 10) Promývání filtru 250 μ l pufru RA3, centrifugace (2 minuty, 11 000 g).
- 11) Přidání 40 μ l RNase-free H₂O na filtr, centrifugace (1 minuta, 11 000 g).
- 12) Přepipetování získaných 40 μ l roztoku na filtr, centrifugace (1 minuta, 11 000 g).
- 13) Uchování vzorků na ledu, následně zamrazení na -20 °C.

Kvalita izolované RNA byla hodnocena pomocí elektroforézy na 1% agarózovém gelu (Serva) s použitím ethidiumbromidu (0,5 μ g/ml, Sigma-Aldrich) a koncentrace celkové RNA byla určena spektrofotometricky při 260 nm.

Následovala reverzní transkripce získané RNA do cDNA podle následujícího postupu:

- 1) Příprava směsi: 1 μ g RNA, 1 μ l náhodných primerů hexamerů (Promega, Madison, WI), 1 μ l deoxynukleotidů (Invitek, Berlin, Germany) a PCR H₂O do celkového objemu 13 μ l.
- 2) Inkubace směsi v thermocycleru (5 minut, 65 °C), zchlazení na ledu.
- 3) Přidání 6 μ l směsi (4 μ l First-strand buffer, 1 μ l 0,1M DDT, 9,5 μ l Rnase out, 0,7 μ l SuperScript III RT – Invitrogen).
- 4) Zahřátí v thermocycleru, program reverzní transkripce:
- 5) 10 minut, 25 °C
- 6) 50 minut, 50 °C
- 7) 15 minut, 70 °C
- 8) Zamrazení vzorku při -20 °C do doby dalšího použití.

Během celého postupu bylo nutné pracovat se vzorky na ledu, aby nedocházelo k nespecifickým vazbám primerů.

5.10 PCR

Pomocí klasické řetězcové polymerázové reakce (polymerase chain reaction, PCR) byla v kožních štěpech sledována exprese genů pro cytokiny IL-1, IL-2, IL-6, IFN- γ a pro další proteiny jako iNOS nebo perforin. Reakční směs byla připravena z 1,5 μ l cDNA, 1,5 μ l směsi specifických 5' a 3' primerů (tabulka č. 1., Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika), 4,5 μ l PCR H₂O a 6 μ l roztoku PPP Master Mix (Top-Bio), který obsahuje Taq Purple DNA-polymerázu.

Amplifikace probíhala podle následujícího postupu:

- 1) Denaturace (92 °C, 2 minuty).
- 2) Denaturace (95 °C, 20 sekund).
- 3) Annealing (60 °C, 20 sekund) .
- 4) Polymerace (72 °C, 20 sekund).
- 5) Kroky 2), 3) a 4) opakovány 22–35x.
- 6) Finální sytýza (72 °C, 10 minut).

Produkty PCR byly dále analyzovány pomocí elektroforézy na 2% agarózovém gelu s ethidiumbromidem. Stanovení exprese genů pro jednotlivé cytokiny a další molekuly vždy předcházela normalizace všech vzorků pomocí house keeping genu pro glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH). Vzorky byly před dalším použitím zmrazeny a skladovány při -20 °C.

Tabulka č. 1. Seznam použitých primerů pro jednotlivé cytokiny, proteiny a house keeping gen.

primer	sekvence
GAPDH S	5'-GGG TGT GAA CCA CGA GAA AT-3'
GAPDH A	5'-ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA-3'
IL-1 S	5'-CAG GAT GAG GAC ATG AGC ACC-3'
IL-1 A	5'-CTC TGC AGA CTC AAA CTC CAC-3'
IL-2 S	5'-GTC AAC AGC GCA CCC ACT TCA AGC-3'
IL-2 A	5'-GCT TGT TGA GAT GAT GCT TTG ACA-3'
IL-6 S	5'-AGT TGC CTT CTT GGG ACT GA-3'
IL-6 A	5'-TTC TGA AAG TGC ATC ATC GT-3'
iNOS S	5'-TGG GAA TGG AGA CTG TCC CAG-3'
iNOS A	5'-GGG ATC TGA ATG TGA TGT TTG-3'
perforin S	5'-GTGGGACTTCAGCTTTCCAG-3'
perforin A	5'-GGTTTTTGTACCAGGCGAAA-3'
(S) - sense, (A) - antisense	

5.11 ELISA

Pomocí ELISA testu (enzyme-linked immunosorbent assay) byla sledována produkce cytokinů IL-10 a IFN- γ buňkami lymfatických uzlin (LNC, lymph node cells) myši (pokus byl proveden vždy pro všechny varianty terapie a kontrolu). Do 24jamkové destičky (Nunc) bylo napipetováno $1,5 \times 10^6$ reaktivních buněk, $1,5 \times 10^6$ ozářených splenocytů (30Gy) myši kmene C57BL/6. Inkubace probíhala ve výsledném objemu 1,5 ml kompletního RPMI 1640 s 10% FCS. Z kultury byly postupně odebírány supernatanty (72 hodin pro stanovení IFN- γ a 96 hodin pro stanovení IL-10).

ELISA test byl využit i při detekci produkce IL-6 během testu vlivu nanovláknenných nosičů na MSC a makrofágy. Do 48jamkové destičky (Costar, Cambridge, MA) bylo napipetováno $0,2 \times 10^6$ čerstvě vypláchnutých peritoneálních makrofágů nebo $1,2 \times 10^4$ MSC, do jamek bylo dále přidáno 0,5 μ g lipopolysacharidu (LPS) (Difco Laboratories, Detroit, MI) a 4 ng IFN- γ (Immunotools, Friesoyte, Germany). Inkubace probíhala v celkovém objemu 400 μ l kompletního media RPMI 1640 s 10% FCS. Po 4 hodinách bylo do každé jamky vloženo nanovlákneno o velikosti 6 x 6 mm. Část jamek zůstala bez nanovláken. Po 48 hodinách byly odebrány supernatanty pro stanovení IL-6.

Se všemi vzorky bylo dále pracováno podle stejného postupu. Při ELISA testu se k promývání používal PBS s přidáním roztokem Tween-20 (PBS/T) (0,5 ml Tween-20, 1 l PBS), jako blokovací roztok sloužil PBS s přidáním FCS v koncentraci 7,5% (PBS/F) a primární protilátka byla naředěna v roztoku NaHCO₃ (200 ml H₂O, 1,68 g NaHCO₃). Byly použity tyto protilátky: Primární a sekundární monoklonální protilátky proti IL-6, IL-10, IFN- γ (Pharmigen, San Diego, CA). Pro kvantifikaci reakce se používaly cytokinové standardy (Genzyme, Boston, MA), jako blank se využívalo čisté kompletní medium RPMI 1640 s 10% FCS a jako substrát sloužil ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), Sagma-Aldrich) s přidáním H₂O₂ (Sigma-Aldrich) (120 mg ABTS + 11 μ l 30% H₂O₂, 7,68 g kyseliny citronové, 400 ml ddH₂O, pH upraveno na 4,35). Test probíhal v 96jamkových vysokoadsorpčních destičkách (Costar) podle následujícího postupu:

- 1) Do každé jamky přidat 50 μ l 0,1M roztoku NaHCO₃ s primární protilátkou, protilátka proti IL-6 a IFN- γ v koncentraci 0,76 μ g/ml, protilátka proti IL-10 v koncentraci 2,38 μ g/ml (4 °C, inkubace přes noc), 2 x promytí v PBS/T.
- 2) 150 μ l PBS/F (laboratorní teplota, inkubace 2 hodiny), 4 x promytí v PBS/T.

- 3) 100 μ l analyzovaného vzorku, cytokinového standardu nebo blanku (4 °C, inkubace přes noc), 4 x promytí v PBS/T.
- 4) 100 μ l PBS/F se sekundární protilátkou, protilátka proti IL-6 a IFN- γ v koncentraci 0,38 μ g/ml, protilátka proti IL-10 v koncentraci 1,19 μ g/ml, (laboratorní teplota, inkubace 45 minut), 6 x promytí v PBS/T.
- 5) 100 μ l avidinperoxidázy (2,5 μ g/ml v PBS/F), (laboratorní teplota, inkubace 30 minut), 8 x promytí v PBS/T.
- 6) 100 μ l substrátu s H₂O₂ (laboratorní teplota, inkubace 10 minut pro IL-6 a INF- γ , 20 minut pro IL-10).

Vzorky byly změřeny na spektrofotometru (OpsysMR) pomocí měřicího filtru nastaveného na hodnotu 405 nm a referenčního filtru na hodnotu 630 nm.

5.12 Měření produkce oxidu dusnatého (NO)

Pro sledování produkce NO makrofágy z kožního štěpu byla odebrána polovina této tkáně. Ta byla rozdělena na třetiny, každá třetina byla nastříhána v 48jamkové destičce (Costar) a inkubována v 440 μ l kompletního media RPMI 1640 s 10% FCS. Supernatanty byly odebírány po 48 hodinách.

Další vzorky byly připraveny z LNC myši (pokus byl proveden vždy pro všechny varianty terapie a kontrolu) a peritoneálních makrofágů kontrolní myši kmene BALB/c. Do 48jamkové destičky (Costar) bylo napipetováno 0,45 x 10⁶ LNC, 0,45 x 10⁶ ozářených splenocytů (30 Gy) myši kmene C57BL/6 a 0,45 x 10⁶ čerstvě odebraných makrofágů. Buňky byly inkubovány v celkovém objemu 450 μ l kompletního media RPMI 1640 s 10% FCS. Supernatanty byly následně odebírány po 48 a 72 hodinách.

Detekce produkce NO byla použita i během testu vlivu nanovlákných nosičů na MSC a makrofágy. Do 48jamkové destičky (Costar) bylo napipetováno 0,2 x 10⁶ čerstvě odebraných peritoneálních makrofágů, nebo 1,2 x 10⁴ MSC. Do jamek bylo dále přidáno 0,5 μ g lipopolysacharidu a 4 ng IFN- γ . Inkubace probíhala v celkovém objemu 400 μ l kompletního media RPMI 1640 s 10% FCS. Po 4 hodinách bylo do každé jamky vloženo nanovlákn o velikosti 6 x 6 mm. Část jamek zůstala bez nanovláken Vzorky byly odebírány po 48 hodinách.

Se všemi vzorky bylo dále pracováno podle stejného postupu. Obsah NO v supernatantech byl stanoven pomocí Griessovy reakce, jako standard byl použit roztok dusitanu sodného (NaNO_3 , Sigma-Aldrich), jako blank sloužilo čisté kompletní medium RPMI 1640 s 10% FCS. Používaly se tyto roztoky: roztok A (0,5 g sulfanilamid (Sigma-Aldrich), 1,5 ml 80% H_3PO_4 , 48,5 ml H_2O), roztok B (0,5 g N-1-naphtylethyldiamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich), 1,5 ml 80% H_3PO_4 , 48,5 ml H_2O). Test probíhal v 96jamkových destičkách (Nunc) podle následujícího postupu:

- 1) Napipetování 100 μl vzorků a standardů.
- 2) Přidání 50 μl roztoku A a 50 μl roztoku B.
- 3) Inkubace (laboratorní teplota, 5 minut).

Vzorky byly změřeny na spektrofotometru (OpsysMR) při vlnové délce 570 nm.

5.13 Proliferační test/test metabolické aktivity buněk

Detekce metabolické aktivity buněk byla použita během testu vlivu nanovlákných nosičů na MSC a makrofágy. Do 96jamkové destičky bylo napipetováno $0,1 \times 10^6$ čerstvě izolovaných peritoneálních makrofágů nebo $0,4 \times 10^4$ MSC. Dále bylo přidáno 0,25 μg LPS a 2 ng IFN- γ . Inkubace probíhala v celkovém objemu 200 μl kompletního media RPMI 1640 s 10% FCS. Po 4 hodinách bylo do každé jamky vloženo nanovlákn o velikosti 3 x 3 mm. Část jamek zůstala bez nanovláken. Test metabolické aktivity buněk probíhal pro makrofágy po 48 hodinách, pro MSC po 72 hodinách. Z buněčných kultur bylo nejprve odebráno nanovlákn a 100 μl media. Do zbylých 100 μl media s buňkami bylo přidáno 10 μl tetrazoliové soli 1 (WST-1, water soluble tetrazolium 1) (Millipore, Billerica, MA). Po čtyřhodinové inkubaci byla intenzita zbarvení korelující s metabolickou aktivitou buněk kvantifikována pomocí spektrofotometru při vlnové délce 450 nm.

5.14 Průtoková cytometrie

FACS analýza byla použita pro měření relativního zastoupení jednotlivých populací buněk v suspenzích LNC myši (pokus byl proveden vždy pro všechny varianty terapie a kontrolu). Po odběru lymfatických uzlin byla provedena homogenizace těchto tkání v 5% kompletním mediu RPMI 1640, filtrace přes nylonovou gázu a získaná suspenze buněk byla centrifugována (8 min, 170 g) a resuspendována v PBS.

Pro FACS analýzu relativního zastoupení jednotlivých populací imunitních buněk byly dále použity kožní štěpy (pokus byl proveden vždy pro všechny varianty terapie a kontrolu). Tkáň byla ihned po odběru nastříhána v 48jamkové destičce (Nunc), ke každému vzorku bylo přidáno 500 μ l 1% kolagenázy II (Sigma-Aldrich) v PBS. Štěpení probíhalo v inkubátoru po dobu 1 hodiny a 45 minut. Během této doby byly vzorky opětovně stříhány a promíchávány. Následně byly buněčné suspenze přefiltrovány přes nylonovou gázu, centrifugovány (8 minut, 170 g) a resuspendovány v PBS.

FACS analýza byla využita také při detekci předem nabarvených MSC (pomocí fluorescenční barvy PKH26). Přítomnost MSC, které migrovaly z nanovláknenných nosičů byla sledována v suspenzích buněk ze slezin, lymfatických uzlin a kožních štěpů. LNC, buňky sleziny a kožní štěpy byly zpracovány stejně, jako je popsáno v prvním a třetím odstavci této kapitoly.

Se všemi vzorky bylo dále pracováno podle následujícího postupu. Buněčné suspenze byly rozpipetovány do 96jamkové mikrotitrační destičky s kulatým dnem (Nunc) po 200 μ l na jamku (přibližně $0,1 \times 10^6$ buněk na jamku). Po dobu barvení byly destičky přechovávány na ledu nebo v lednici. Při přípravě buněčných suspenzí se využívaly tyto pufrы a roztoky: fixační/permeabilizační pufr naředěný 1:3 v ředícím roztoku (eBioscience, San Diego, CA), permeabilizační pufr (eBioscience) naředěný 1:10 destilovanou vodou.

Při měření byly použity monoklonální protilátky (mAb, monoclonal antibody) konjugované s fluorochromy Alexa Fluor 700 (Alexa 700), allofukocyanin (APC, allophycocyanine), fluorescein isothiokyanát (FITC, fluorescein isothiocyanate), fykoerytrin (PE, phycoerythrin) (viz tabulka č. 1). Protilátky používané pro detekci povrchových znaků byly naředěny v PBS, pro detekci intracelulárních znaků v permeabilizačním pufru.

Tabulka č. 2. Protilátky použité pro charakterizaci buněk

detekovaný znak	konjugovaný fluorochrom	koncentrace (mg/ml)	výrobce	používané ředění	poznámka
CD4	Alexa 700	0,5	BioLegend	1:55	povrchové značení
CD4	FITC	0,5	BD Pharmingen	1:55	povrchové značení
CD8a	APC	0,2	BioLegend	1:50	povrchové značení
CD11b	APC	0,2	BioLegend	1:50	povrchové značení
CD11c	APC	0,2	eBioscience	1:50	povrchové značení
CD19	PE	0,2	BioLegend	1:50	povrchové značení
CD25	APC	0,5	eBioscience	1:50	povrchové značení
CD25	FITC	0,5	eBioscience	1:50	povrchové značení
CD45	PE	0,2	BioLegend	1:60	povrchové značení
CD69	PE	0,2	BioLegend	1:50	povrchové značení
CD80	FITC	0,5	BioLegend	1:50	povrchové značení
CD86	PE	0,2	BioLegend	1:50	povrchové značení
FoxP3	PE	0,2	eBioscience	1:50	intracelulární značení
ROR γ t	PE	0,2	eBioscience	1:45	intracelulární značení

Pro značení mrtvých buněk byl použit Hoechst 33258 (Sigma) ředěný 1:40000 v PBS, v případě fixovaných a permeabilizovaných buněk byla použita barva Fixable Viability Die eFluor[®] 450 ředěná 1:1000 v PBS (eBioscience).

Při měření suspenzí, kde byly přítomny předem nabarvené MSC, byla peleta buněk rozvolněna a ke každému vzorku bylo přidáno 400 μ l PBS. Tyto buňky nebyly barveny na žádné další povrchové nebo intracelulární znaky.

Při detekci povrchových znaků byly vzorky obarveny podle následujícího postupu:

- 1) Centrifugace (3 minuty, 170 g).
- 2) Rozvolnění pelety buněk, přidání 10 μ l protilátky proti povrchovým znakům.
- 3) Inkubace ve tmě (4°C, 30 minut).
- 4) 2 x promytí 200 μ l PBS, centrifugace (3 min, 170 g).
- 5) Naředění do 200 μ l PBS.
- 6) 10 minut před měřením přidání 20 μ l Hoechst 33258.

Při detekci povrchových znaků současně s intracelulárními transkripčními faktory byly vzorky obarveny podle následujícího postupu:

- 1) Centrifugace (3 minuty, 170g).
- 2) Rozvolnění pelety buněk, přidání 10 μ l protilátky proti povrchovým znakům a odpovídajícím množství kitu pro značení mrtvých buněk.

- 3) Inkubace ve tmě (4°C, 30 minut).
- 4) 2 x promytí 200 µl PBS, centrifugace (3 min, 170 g).
- 5) Rozvolnění pelety buněk, přidání 100 µl fixačního/permeabilizačního pufru.
- 6) Inkubace ve tmě (4°C, 30 minut).
- 7) 2 x promytí 200 µl permeabilizačního pufru, centrifugace (3 min, 170 g).
- 8) Rozvolnění pelety buněk, přidání 10 µl protilátky proti intracelulárním znakům (ředěno v permeabilizačním pufru).
- 9) Inkubace ve tmě (4°C, 30 minut).
- 10) 2 x Promytí 200 µl permeabilizačního pufru, centrifugace (3 min, 170g).
- 11) Naředění do 200 µl permeabilizačního pufru.

Měření probíhalo pro všechny vzorky stejným způsobem pomocí průtokového cytometru LSR II.

5.15 Statistická analýza

Pro prezentaci dat byla využita hodnota aritmetického průměru, přičemž do grafu byla zároveň zanesena směrodatná odchylka. Statistická signifikance byla stanovena pomocí Studentova t-testu. Hodnoty $P \leq 0,05$ (*) nebo $P \leq 0,01$ (**) byly považovány za signifikantní.

6 Výsledky

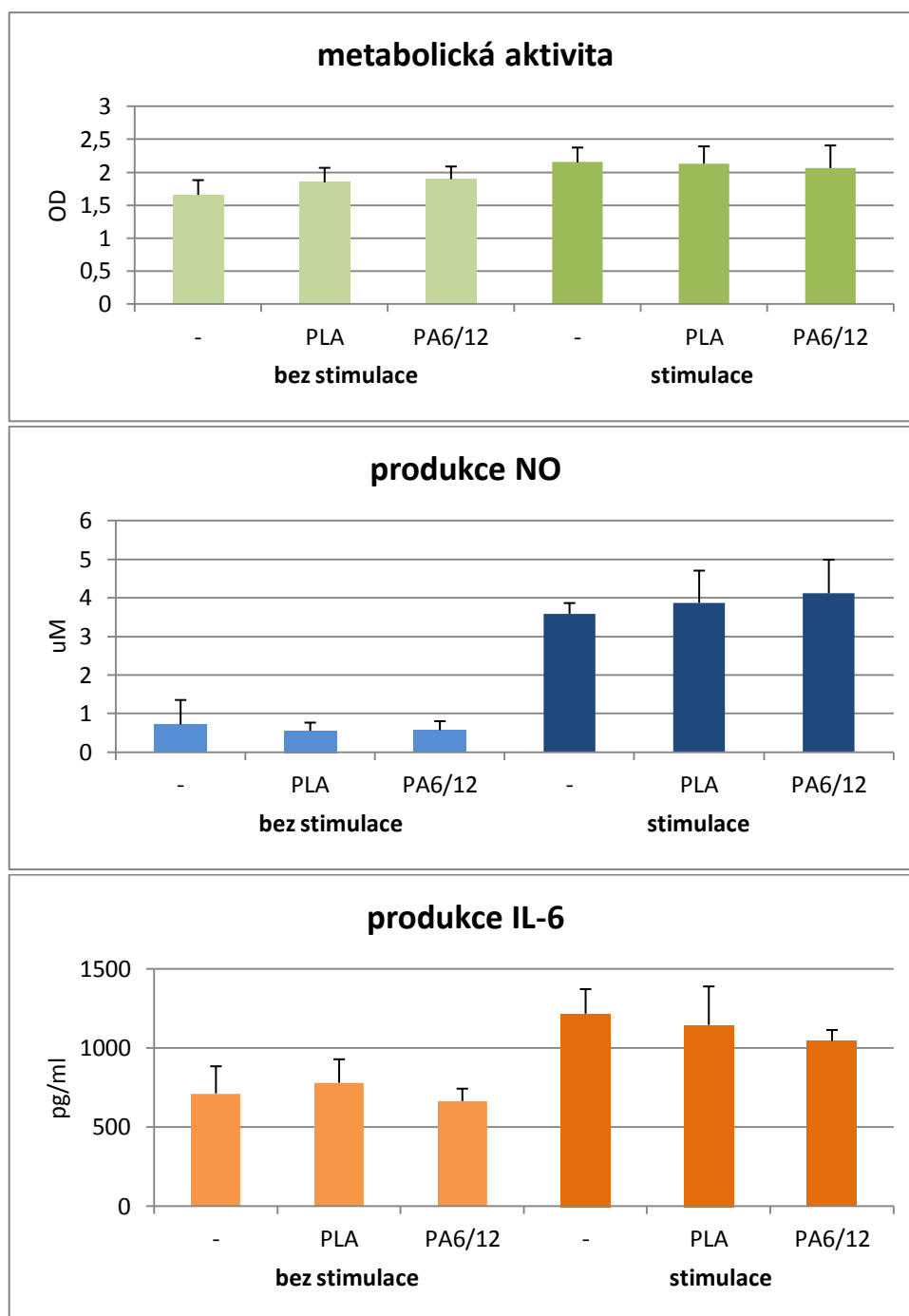
6.1 Vliv nanovláknenných nosičů na MSC

Cílem práce bylo sledovat vliv MSC na probíhající imunitní reakce po transplantaci kožního štěpu. Jelikož byly MSC podávány na nanovláknenných nosičích, bylo nutné provést testy vlivu těchto nanovláken na přežívání a aktivitu MSC.

Za tímto účelem byly MSC kultivovány v přítomnosti nanovláknenných nosičů připravených z PLA nebo PA6/12. Porovnával se vliv nanovláken na metabolickou aktivitu MSC a na jejich produkci NO a IL-6. NO patří mezi rozpustné mediátory MSC působící na řadu imunitních i neimunitních buněk, IL-6 se řadí mezi imunostimulační cytokiny a je produkován lymfocyty, monocyty, makrofágy, ale také neimunitními buňkami, jako jsou epitelie, fibroblasty a právě MSC. MSC stejně jako makrofágy produkují NO až po stimulaci, IL-6 však produkují v nižších hladinách i bez této stimulace. Ve všech testech byly využity jak MSC stimulované, tak nestimulované buňky.

Bylo zjištěno (obr. 7), že přidání nanovláknenných nosičů neovlivňuje metabolickou aktivitu MSC. Nanovláknena nemají vliv ani na produkci NO MSC, přičemž nezáleží na tom, zda byly MSC stimulovány, nebo ne. Stejný trend je možné pozorovat i u produkce IL-6.

Tyto výsledky ukázaly, že ani jeden druh nanovláknenných nosičů nemá výrazný vliv na funkční aktivitu MSC. U nanovláken vyrobených z PA6/12 byl však pozorován mírný pokles produkce IL-6 a NO MSC (obr. 7). Pro další pokusy byly proto vybrány nanovláknenné nosiče z PLA.



Obrázek 7. Vliv nanovláknenných nosičů na viabilitu MSC a jejich produkci NO a IL-6.

MSC nestimulované nebo stimulované pomocí LPS a IFN- γ byly kultivovány samostatně (-), nebo v přítomnosti nanovláknenných nosičů (PLA / PA6/12). Metabolická aktivita MSC byla detekována pomocí přeměny substrátu WST-1 na barevný produkt a měřena spektrofotometricky. Produkce NO byla určena pomocí Griessovy reakce ze supernatantů a měřena spektrofotometricky. Ze supernatantů byl stanoven i obsah IL-6 pomocí ELISA testu. Data představují průměry + standardní odchylku (SD, standard deviation) ze tří nezávislých pokusů, nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl od kontrolních vzorků. PA6/12, PLA-nanovláknenné nosiče.

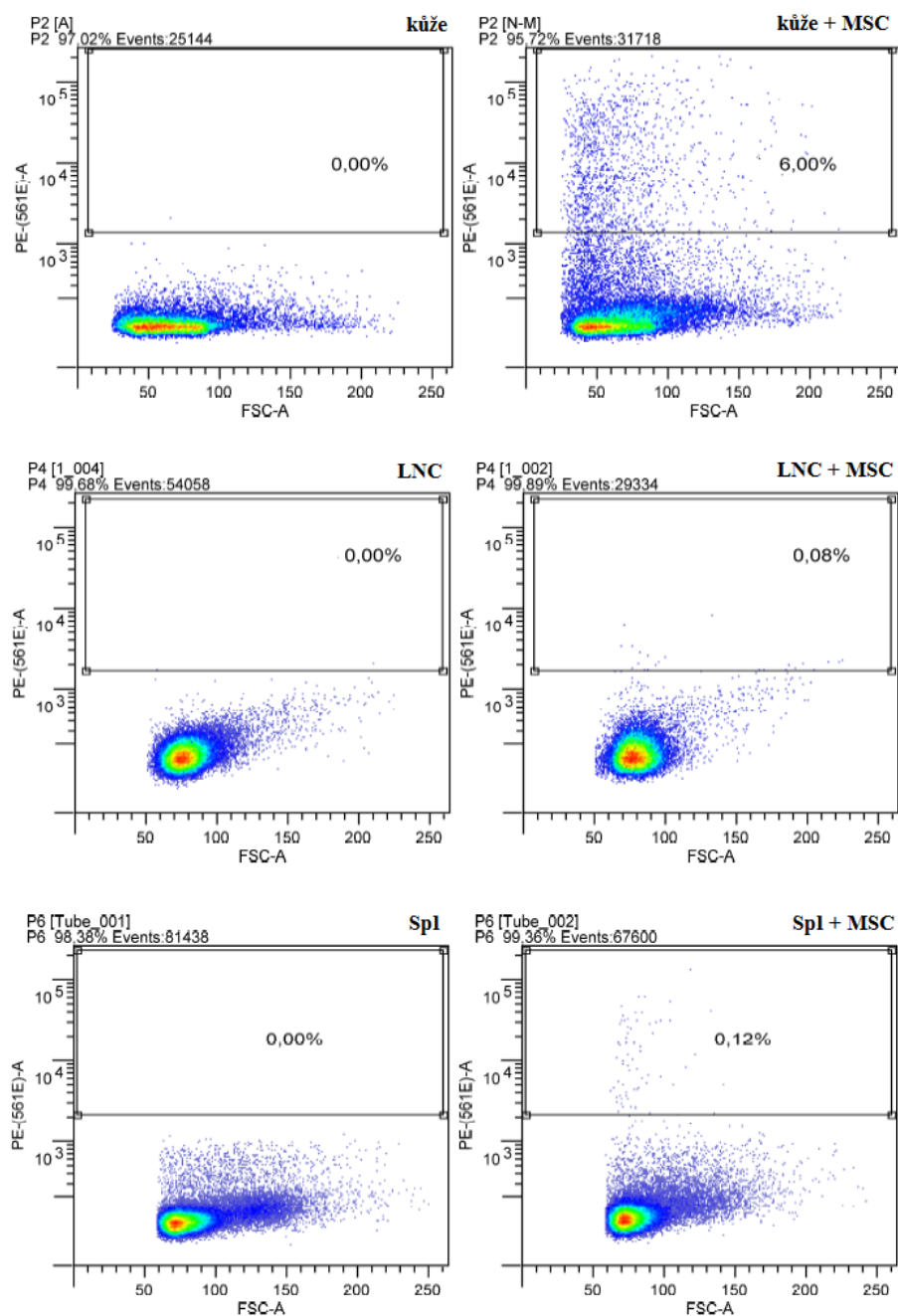
6.2 Test migrace aplikovaných MSC

Pro další pokusy a analýzu imunitní odpovědi bylo nutné určit, zda MSC zůstávají na nanovlákněném nosiči a působí jen lokálně, nebo zda migrují do tkání. Vycházelo se z dřívějších pokusů a jiných prací, kde bylo zjištěno, že MSC migrují nejen do místa poranění, ale i do lymfatických tkání. Za tímto účelem byla testována tkáň lymfatické uzliny, sleziny a kožní transplantát.

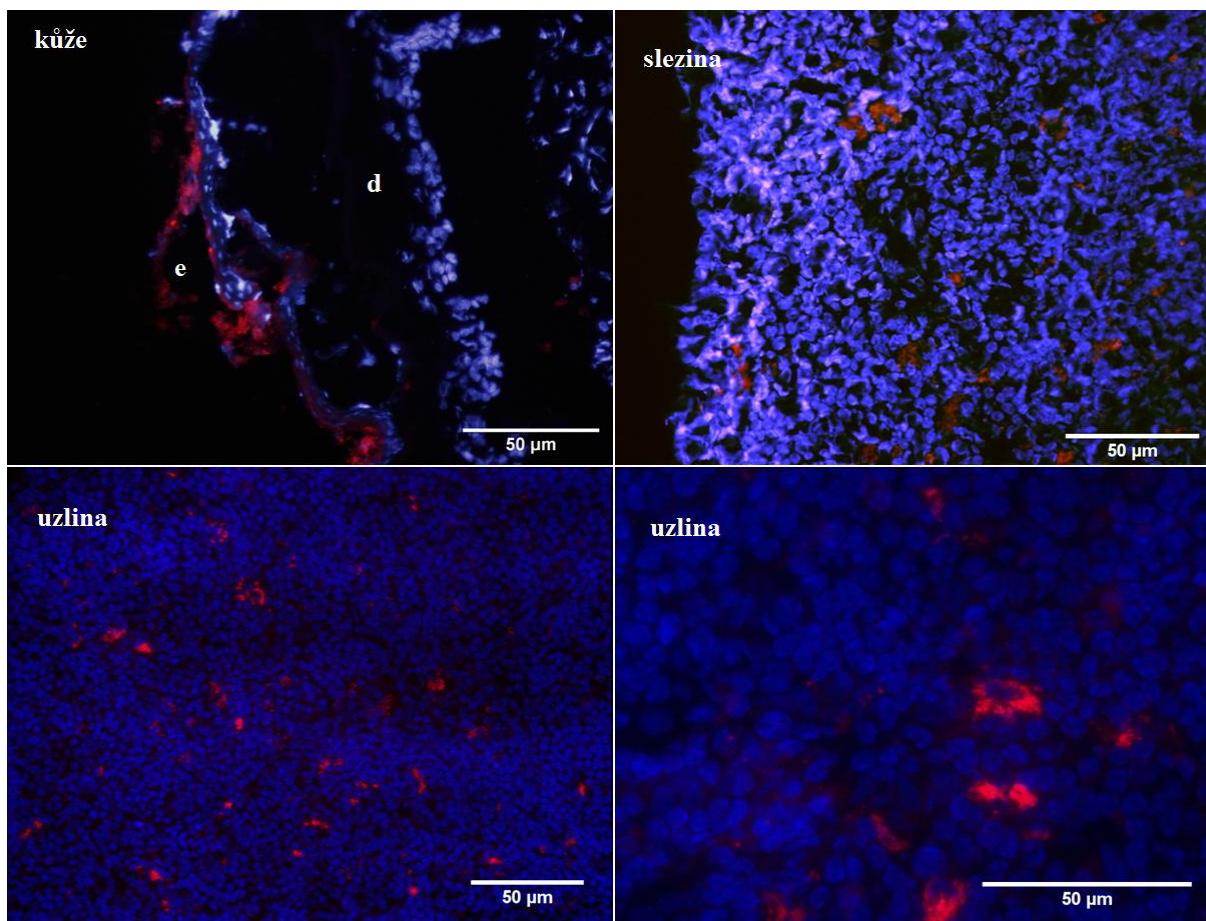
Ve všech případech byly myšim aplikovány spolu s transplantátem předem značené MSC na nanovlákněných nosičích. Pomocí fluorescenční značky PKH 26 tak bylo po šesti dnech možné analyzovat, zda MSC migrují z nanovlákněných nosičů do rány a zda zůstávají pouze v transplantátu, nebo je lze detekovat i v jiných tkáních. Distribuce značených MSC byla sledována pomocí průtokové cytometrie suspenzí buněk z jednotlivých tkání a prostřednictvím detekce fluorescenčně značených MSC v kryorezech.

Analýzou na průtokovém cytometru bylo zjištěno, že po šesti dnech od transplantace tvoří MSC přibližně 6 % buněk v suspenzi získané enzymatickou disociací kožních transplantátů, 0,08 % buněk suspenze získané z lymfatické uzliny a 0,12 % buněk suspenze získané ze sleziny myši (obr. 8).

Ve všech třech typech tkání bylo možné MSC detekovat rovněž imunohistochemickými metodami (obr. 9).



Obrázek 8. Distribuce fluorescenčně značených MSC pomocí průtokové cytometrie. MSC značené fluorescenční značkou PKH 26 byly aplikovány na nanovláknenných nosičích na kožní transplantát. Po šesti dnech byla odebrána tkáň uzlin, slezin a kožních transplantátů a pomocí průtokové cytometrie bylo zjišťováno procentuální zastoupení MSC v jednotlivých suspenzích buněk. Data jsou znázorněna prostřednictvím dotplotů, levý sloupec představuje tkáň z kontrolních myší, kterým nebyly podány MSC, pravý sloupec tkáň z myší, kterým byly podány značené MSC na nanovláknenných nosičích. Data prezentují jeden ze tří nezávislých pokusů. LNC – buňky lymfatických uzlin, spl-splenocyty.



Obrázek 9. Distribuce fluorescenčně značených MSC pomocí imunohistochemie. MSC značené červenou fluorescenční barvou PKH 26 byly aplikovány na nanovláknenných nosičích na kožní transplantát. Po šesti dnech byla odebrána tkáň uzlin, slezin a kožních transplantátů a pomocí ultratenkých řezů byly v těchto tkáních detekovány MSC. Modrý kanál znázorňuje buněčná jádra obarvená DAPI. Na obrázku je jeden reprezentativní výsledek ze tří opakování. Měřítko: 50 µm, d-dermis, e-epidermis.

6.3 Kinetika odhojování kožních transplantátů

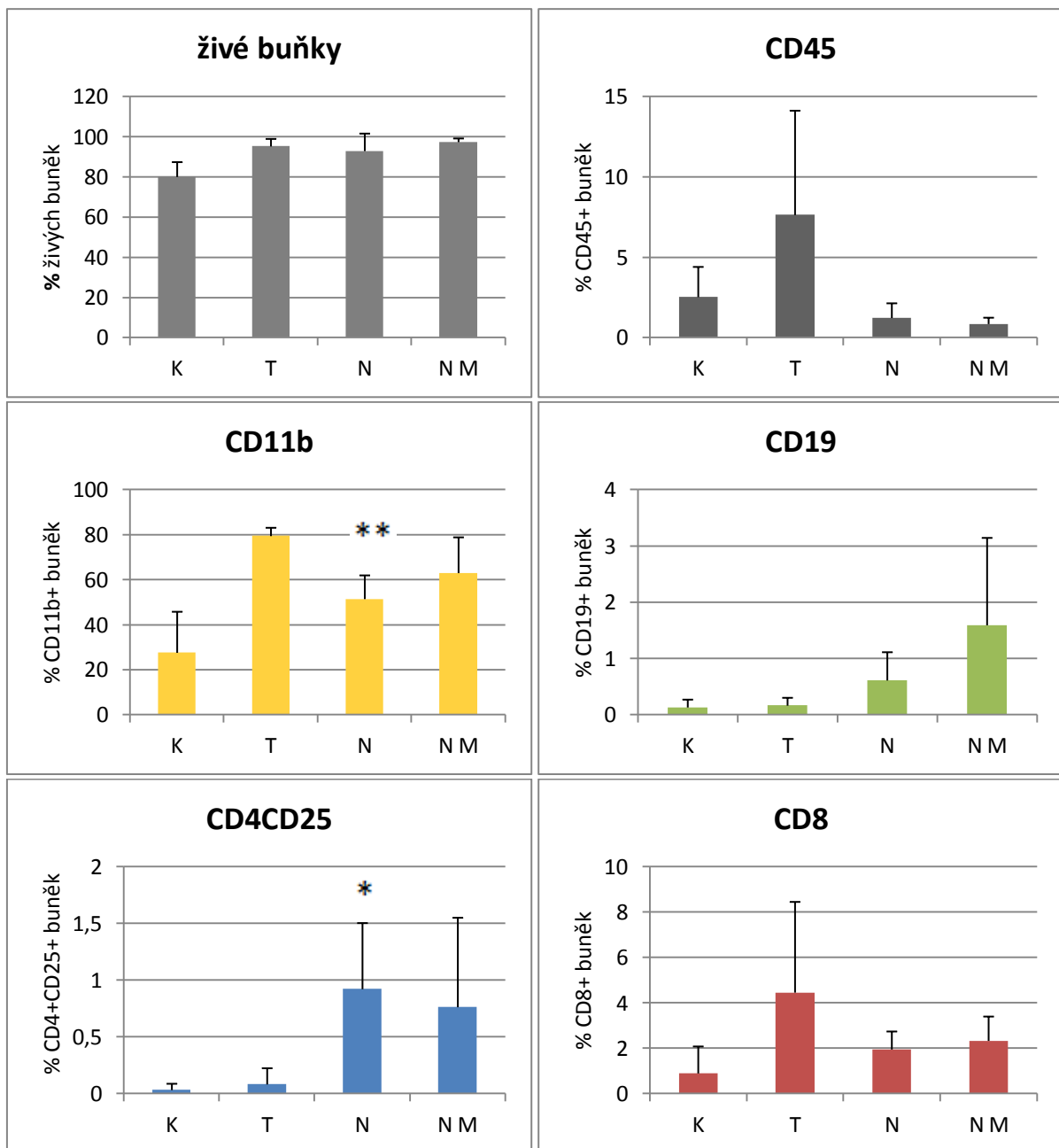
Pro stanovení systémové i lokální imunitní odpovědi na kožní transplantát a pro porovnání jednotlivých variant terapie bylo nutné určit jednotný časový úsek pro odebrání tkání. Aby bylo možné stanovit nejvhodnější odběrový den od transplantace, byla provedena série pokusů, kdy byly porovnávány některé varianty terapie a jejich působení na imunitní odpověď přímo v místě transplantace, a to pomocí FACS analýzy a srovnávání morfologie na histologických preparátech z kožních transplantátů. Pro tyto účely byly používány následující varianty: kožní alotransplantát (T), kožní alotransplantát překrytý nanovláčným nosičem (N) kožní alotransplantát překrytý nanovláčným nosičem s adherovanými MSC (N M). Jako kontrolní byla použita netransplantovaná kůže (K). Kožní transplantát byl pro další analýzu odebrán v časových úsecích 2, 4, 6, 8 a 10 dní od transplantace.

6.3.1 Průtoková cytometrie

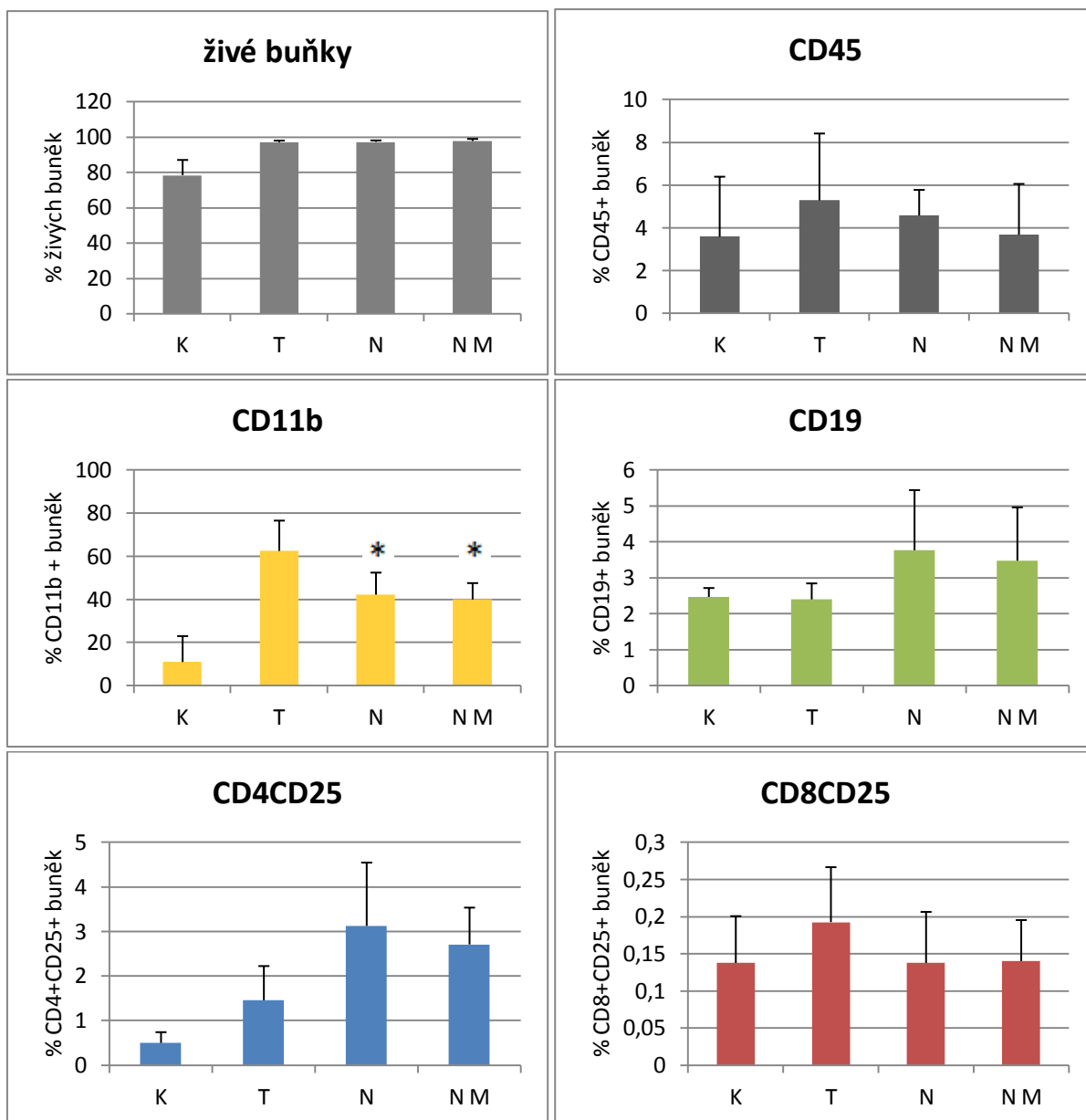
Relativní zastoupení imunitních buněk bylo detekováno pomocí průtokové cytometrie. Byly vybrány protilátky proti povrchovým znakům CD4 pro Th lymfocyty, CD8 pro Tc lymfocyty a současně ještě CD25 pro aktivované lymfocyty. Dále byly používány protilátky proti znakům CD11b pro makrofágy, monocyty, NK buňky a CD19 pro B buňky. Všechny suspenze buněk ze štěpů byly porovnávány z hlediska zastoupení mrtvých buněk a z důvodu přesnější analýzy byla pro všechna měření suspenzí z kůže pomocí průtokového cytometru použita protilátka proti povrchovému znaku všech leukocytů CD45.

Na obrázcích 10–13 jsou graficky znázorněny výsledky. Nejsou zde uváděny výsledky z 2. dne, protože počet získaných buněk byl tak malý, že analýza na průtokovém cytometru neposkytovala relevantní výsledky. Bylo zjištěno, že počet živých buněk v suspenzi se v jednotlivých pokusech ani u různě léčených myší významně neměnil. Zato počet leukocytů byl vždy nejvyšší u neléčených myší s transplantátem a celkově bylo největší množství leukocytů pozorováno ve vzorcích odebíraných po 10 dnech. Dále je možné konstatovat, že ve všech časových odstupech mělo procentuální zastoupení CD11b pozitivních buněk v suspenzi podobný trend. U neléčených myší s transplantátem se jejich počet vždy zvýšil a u léčených myší snížil. Výsledky současně ukazují, že tyto buňky tvoří největší podíl leukocytů v kožním transplantátu. Jinak je tomu u CD19 pozitivních buněk. Byl pozorován jejich procentuální nárůst u myší léčených nanovláčným nosičem s adherovanými MSC ve

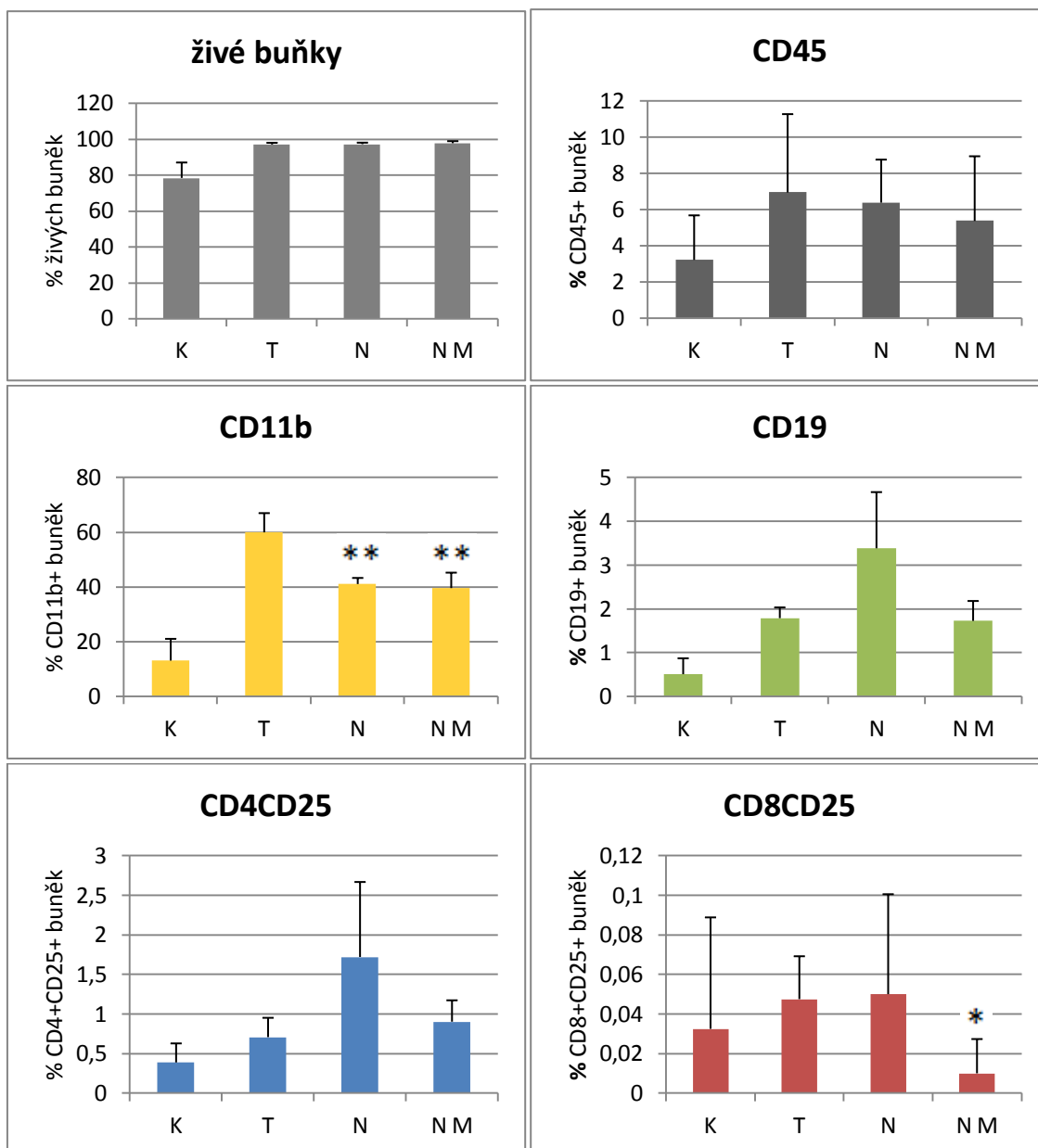
vzorcích odebraných po čtyřech dnech (obr. 10). Ve vzorcích ze šestého a osmého dne je jejich počet nejvyšší u myší, kterým byly podány nanovláknenné nosiče a desátý den se jejich počet u myší léčených i neléčených téměř srovnal na stejnou hodnotu (obr. 11–13). Počet CD8CD25 pozitivních Tc buněk byl ve všech případech velmi nízký, po čtvrtém dni nebyly tyto buněky dokonce detekovatelný vůbec. Z toho důvodu je zde uveden pouze graf znázorňující zastoupení CD8 pozitivních buněk. Ve všech časových intervalech bylo možné sledovat navýšení počtu CD8CD25 pozitivních buněk u myší po transplantaci a stejně jako v předchozím případě i zde lze pozorovat inhibiční efekt podaných MSC (obr. 10–13).



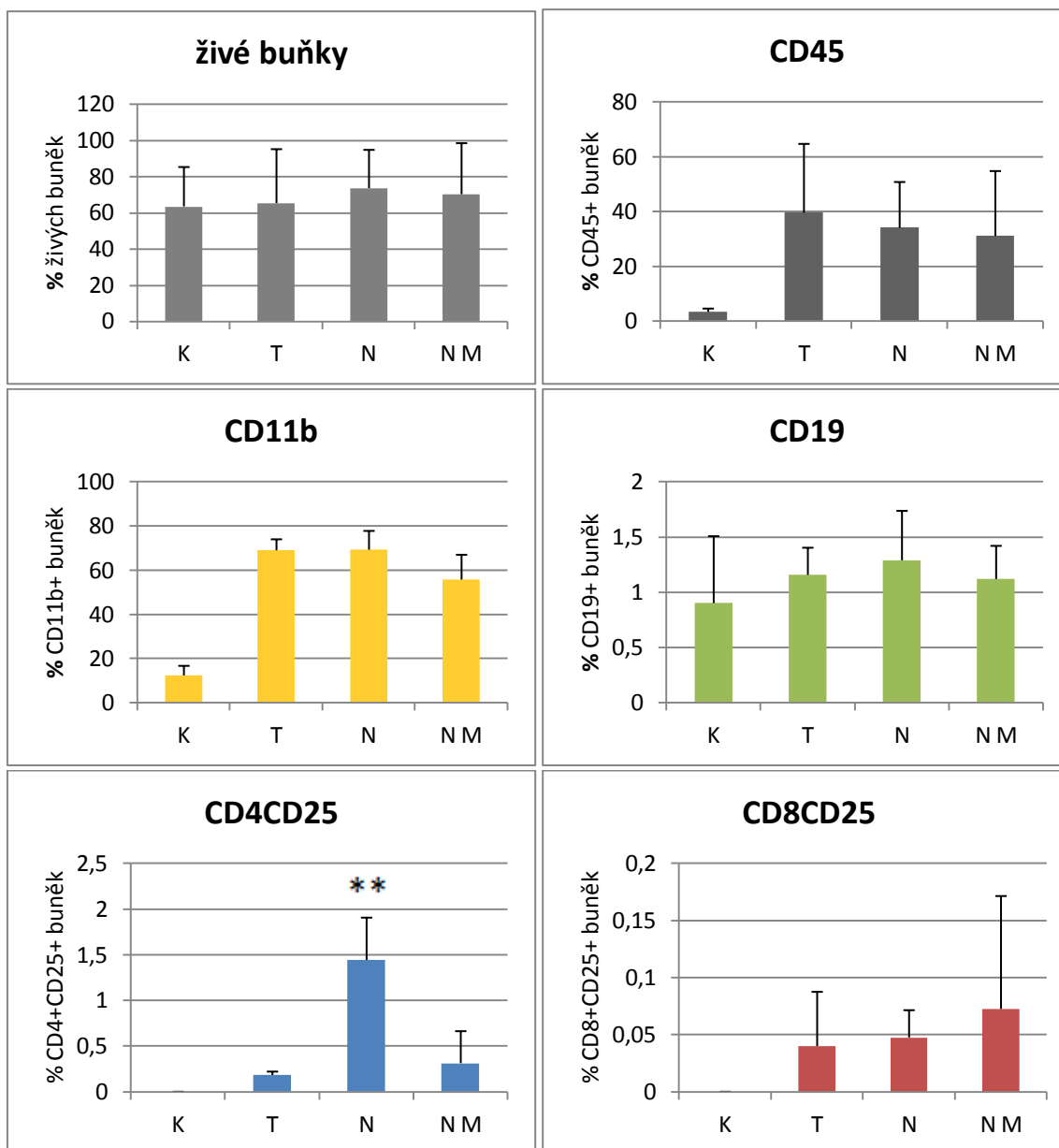
Obrázek 10. Relativní zastoupení buněčných populací leukocytů v kožních štěpech po čtyřech dnech od transplantace. Obrázek znázorňuje data získaná FACS analýzou suspenzí buněk z kožních transplantátů. K – netransplantovaná kůže, T – kožní allotransplantát, N – kožní allotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem, N M – kožní allotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem s adherovanými MSC. Data představují průměry + SD ze dvou nezávislých pokusů (tzn. celkem čtyři myši pro každou variantu terapie) (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ oproti kožnímu allotransplantátu).



Obrázek 11. Relativní zastoupení buněčných populací leukocytů v kožních štěpech po šesti dnech od transplantace. Obrázek znázorňuje data získaná FACS analýzou suspenzí buněk z kožních transplantátů. K – netransplantovaná kůže, T – kožní alotransplantát, N – kožní alotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem, N M – kožní alotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem s adherovanými MSC. Data představují průměry + SD ze dvou nezávislých pokusů (tzn. celkem čtyři myši pro každou variantu terapie) (* $P \leq 0,05$ oproti kožnímu alotransplantátu).



Obrázek 12. Relativní zastoupení buněčných populací leukocytů v kožních štěpech po osmi dnech od transplantace. Obrázek znázorňuje data získaná FACS analýzou suspenzí buněk z kožních transplantátů. K – netransplantovaná kůže, T – kožní alotransplantát, N – kožní alotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem, N M – kožní alotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem s adherovanými MSC. Data představují průměry + SD ze dvou nezávislých pokusů (tzn. celkem čtyři myši pro každou variantu terapie) (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ oproti kožnímu alotransplantátu).

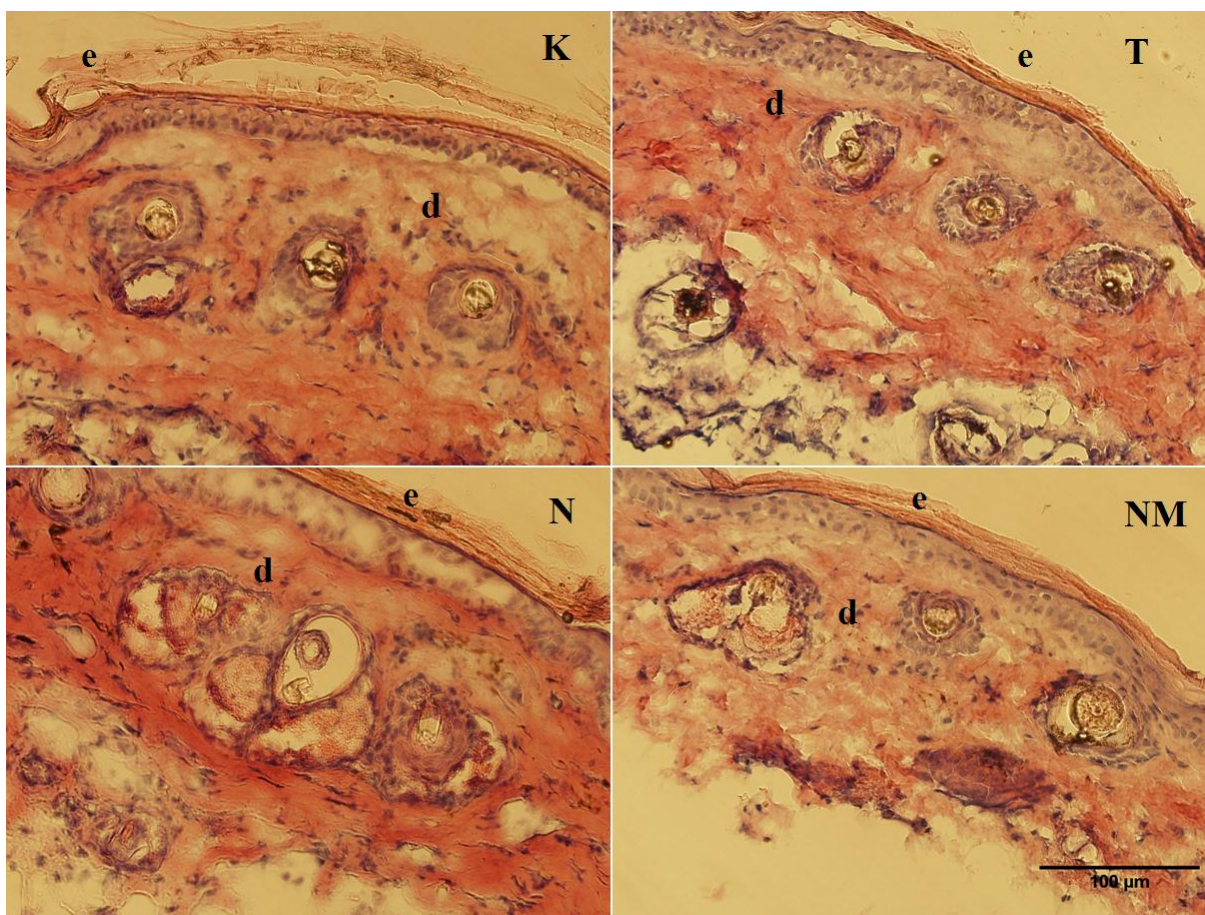


Obrázek 13. Relativní zastoupení buněčných populací leukocytů v kožních štěpech po deseti dnech od transplantace. Obrázek znázorňuje data získaná FACS analýzou suspenzí buněk z kožních transplantátů. K – netransplantovaná kůže, T – kožní alotransplantát, N – kožní alotransplantát překrytý nanovlákněným nosičem, N M – kožní alotransplantát překrytý nanovlákněným nosičem s adherovanými MSC. Data představují průměry + SD ze dvou nezávislých pokusů (tzn. celkem čtyři myši pro každou variantu terapie) (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ oproti kožnímu alotransplantátu).

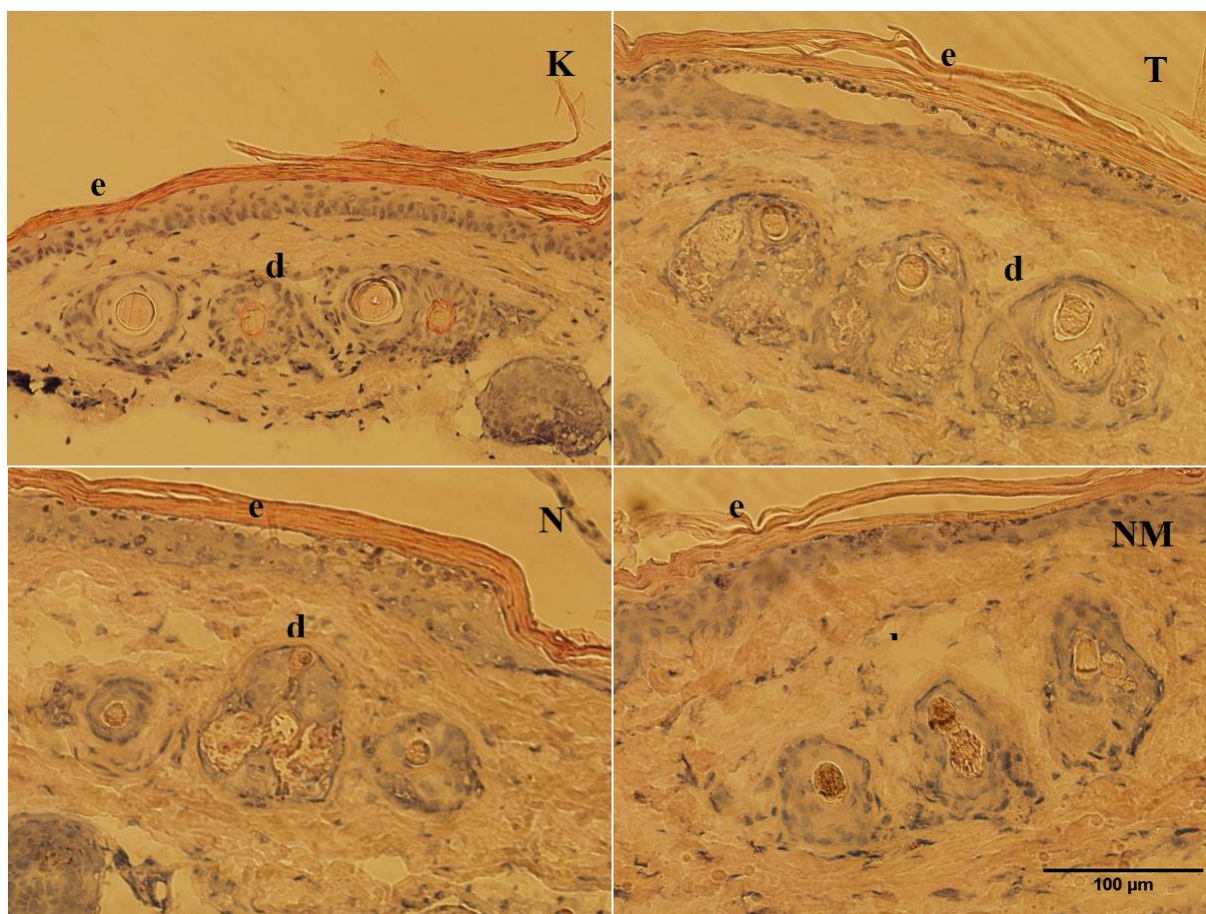
6.3.2 Porovnání morfologie tkáně kožních štěpů

Pro srovnání morfologie kožních transplantátů a buněčné infiltrace této tkáně byla vždy část kůže odebrána pro histochemickou analýzu. Ultratenké řezy tkání byly obarveny hematoxylinem a eosinem a u jednotlivých variant terapie byla porovnávána morfologická změna v jednotlivých časových odstupech.

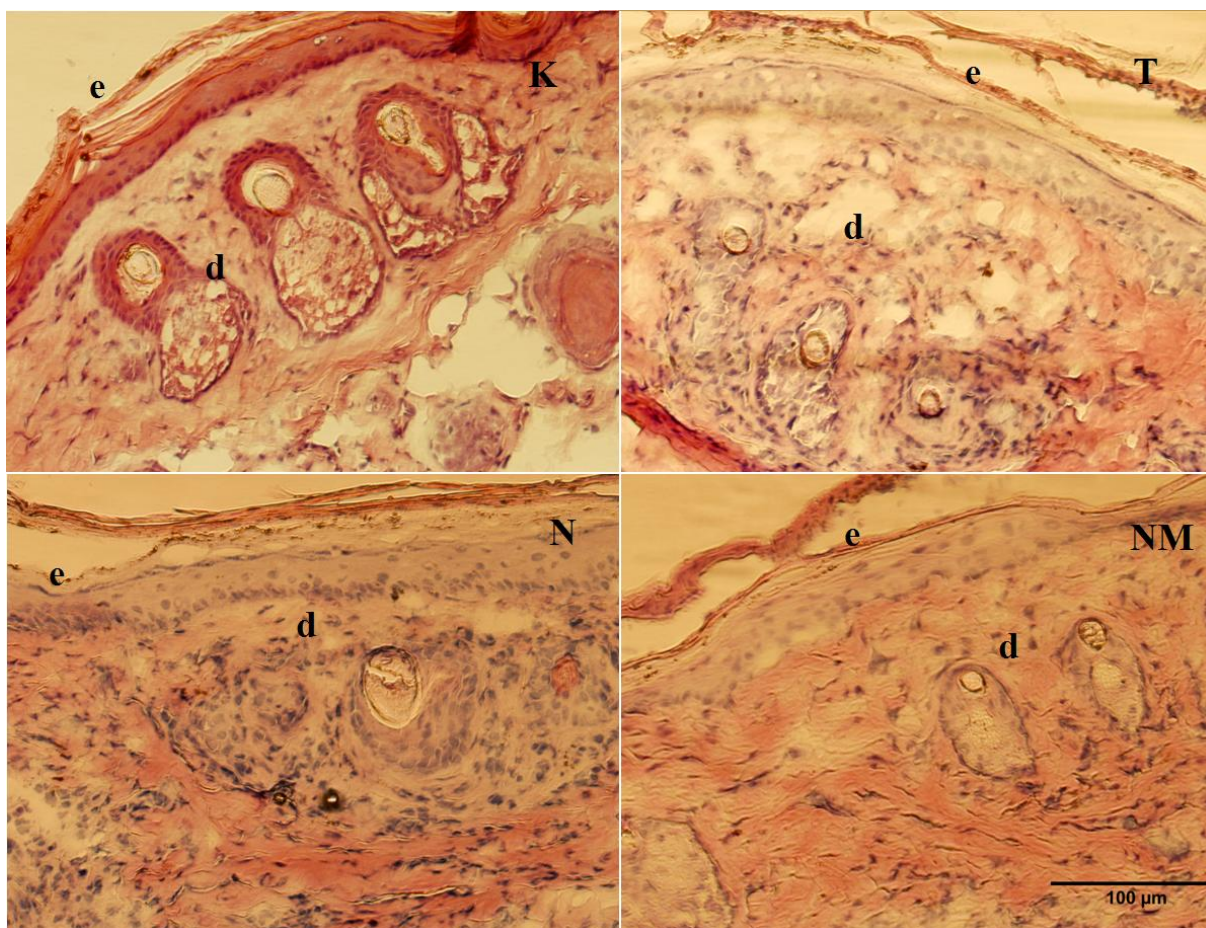
Bylo zjištěno, že odhojovací reakce se na morfologii kůže viditelně projevuje od šestého dne (obr. 16), přičemž mezi osmým (obr. 17) a desátým dnem (obr. 18) už je tak rozvinutá, že téměř nelze pozorovat změny mezi variantami terapie, navíc se v této fázi již začala odhojovat epidermis.



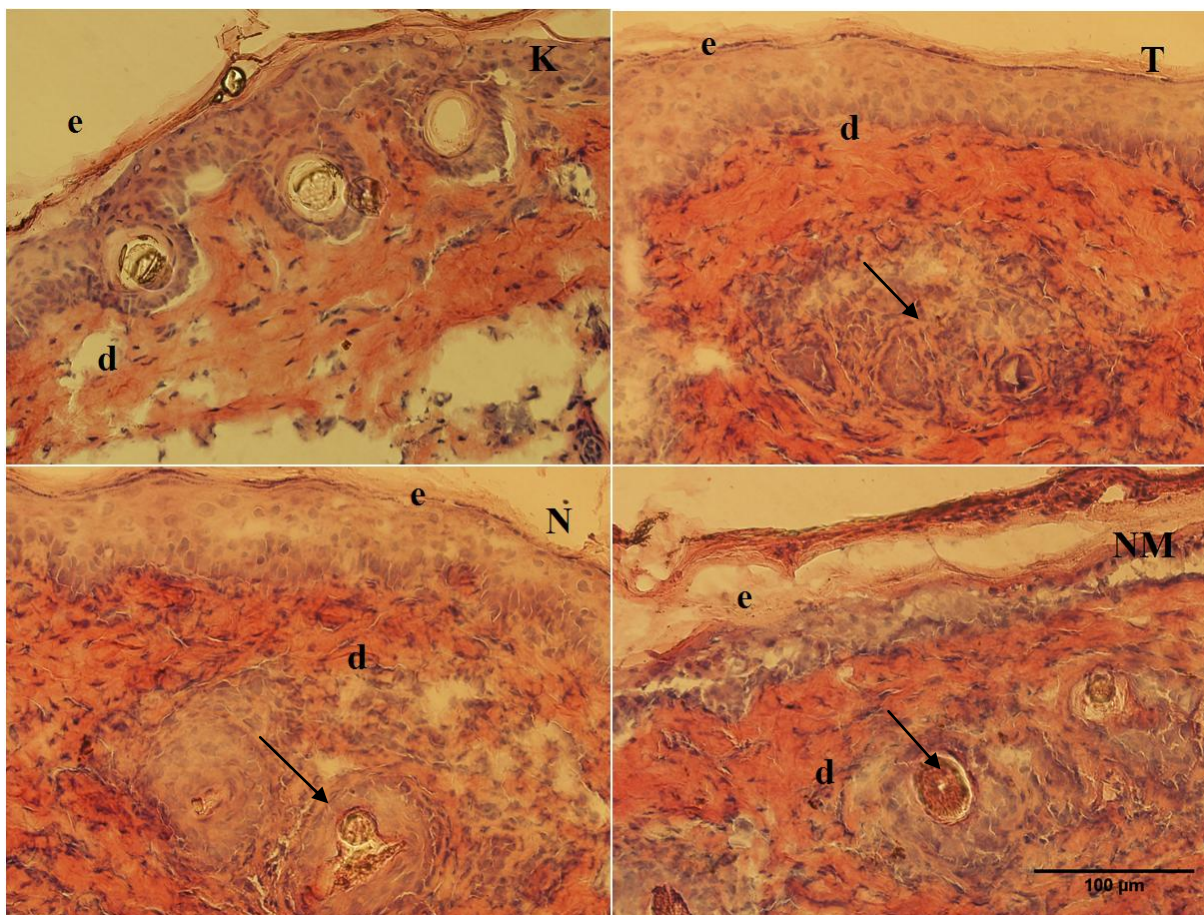
Obrázek 14. Morfologie kožních transplantátů druhý den po transplantaci. Obrázky znázorňují řezy zdravé kůže a alotransplantátů u jednotlivých variant terapie: K – netransplantovaná kůže, T – kožní alotransplantát, N – kožní alotransplantát překrytý nanovlákněným nosičem, N M – kožní alotransplantát překrytý nanovlákněným nosičem s adherovanými MSC. Buněčná jádra jsou obarvena hematoxylinem (fialovo-modrá), cytoplazma buněk, svalová vlákna, kolagen a jiné eosinofilní struktury eosinem (růžovo-červená). Mezi variantami terapie nejsou pozorovatelné rozdíly. Měřítka: 100 µm. d-dermis, e-epidermis .



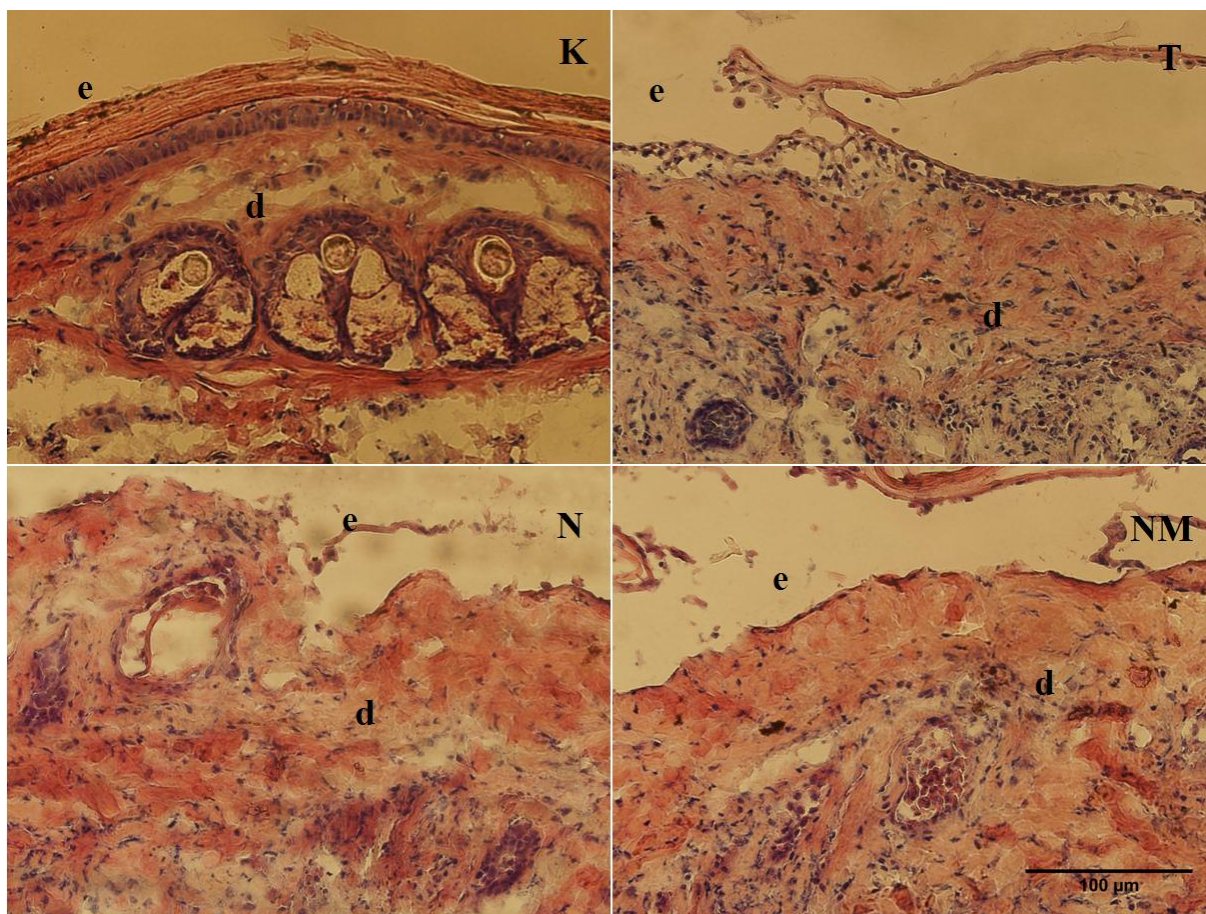
Obrázek 15. Morfologie kožních transplantátů čtvrtý den po transplantaci. Obrázky znázorňují řezy zdravé kůže a alotransplantátů u jednotlivých variant terapie: K – netransplantovaná kůže, T – kožní alotransplantát, N – kožní alotransplantát překrytý nanovlákněným nosičem, N M – kožní alotransplantát překrytý nanovlákněným nosičem s adherovanými MSC. Buněčná jádra jsou obarvena hematoxylinem (fialovo-modrá), cytoplazma buněk, svalová vlákna, kolagen a jiné eosinofilní struktury eosinem (růžovo-červená). Mezi variantami terapie nejsou pozorovatelné rozdíly. Měřítko: 100 µm. d-dermis, e-epidermis .



Obrázek 16. Morfologie kožních transplantátů šestý den po transplantaci. Obrázky znázorňují řezy zdravé kůže a alotransplantátů u jednotlivých variant terapie: K – netransplantovaná kůže, T – kožní alotransplantát, N – kožní alotransplantát překrytý nanovlákněným nosičem, N M – kožní alotransplantát překrytý nanovlákněným nosičem s adherovanými MSC. Buněčná jádra jsou obarvena hematoxylinem (fialovo-modrá), cytoplazma buněk, svalová vlákna, kolagen a jiné eosinofilní struktury eosinem (růžovo-červená). U transplantátu (T) je vidět nabobtnání tkáně v oblasti dermis. U myši léčené pomocí nanovlákněných nosičů s adherovanými MSC (N M) je patrná menší buněčná infiltrace ve srovnání s variantami T a N. Měřítka: 100 µm. d-dermis, e-epidermis.



Obrázek 17. Morfologie kožních transplantátů osmý den po transplantaci. Obrázky znázorňují řezy zdravé kůže a alotransplantátů u jednotlivých variant terapie: K – netransplantovaná kůže, T – kožní alotransplantát, N – kožní alotransplantát překrytý nanovlákněným nosičem, N M – kožní alotransplantát překrytý nanovlákněným nosičem s adherovanými MSC. Buněčná jádra jsou obarvena hematoxylinem (fialovo-modrá), cytoplazma buněk, svalová vlákna, kolagen a jiné eosinofilní struktury eosinem (růžovo-červená). U transplantátu (T) a transplantátu, který byl překryt nanovlákněným nosičem (N), je patrné nabobtnání tkáně v oblasti dermis. Oproti transplantátu, který byl překryt nanovlákněným nosičem s adherovanými MSC (N M), lze u ostatních transplantátů (T a N) také pozorovat poškození morfologie tkáně v oblasti folikulů chlupů (šipky). Buněčná infiltrace je u všech variant terapie srovnatelná. Měřítka: 100 µm. d-dermis, e-epidermis.



Obrázek 18. Morfologie kožních transplantátů desátý den po transplantaci. Obrázky znázorňují řezy zdravé kůže a alotransplantátů u jednotlivých variant terapie: K – netransplantovaná kůže, T – kožní alotransplantát, N – kožní alotransplantát překrytý nanovlákněným nosičem, N M – kožní alotransplantát překrytý nanovlákněným nosičem s adherovanými MSC. Buněčná jádra jsou obarvena hematoxylinem (fialovo-modrá), cytoplazma buněk, svalová vlákna, kolagen a jiné eosinofilní struktury eosinem (růžovo-červená). U myši s transplantátem (T) a myši léčené pomocí nanovlákněných nosičů s adherovanými MSC (N M) je dobře vidět odlučování epidermis. Ve struktuře kůže léčených i neléčených myší nejsou patrné rozdíly a nejsou zde ani dobře rozeznatelné folikuly chlupů. Měřítka: 100 µm. d-dermis, e-epidermis.

Na základě výsledků z analýzy na průtokovém cytometru a porovnávání morfologie tkáně kožních transplantátů byl pro další podrobnější analýzu imunitní odpovědi vybrán šestý den od transplantace.

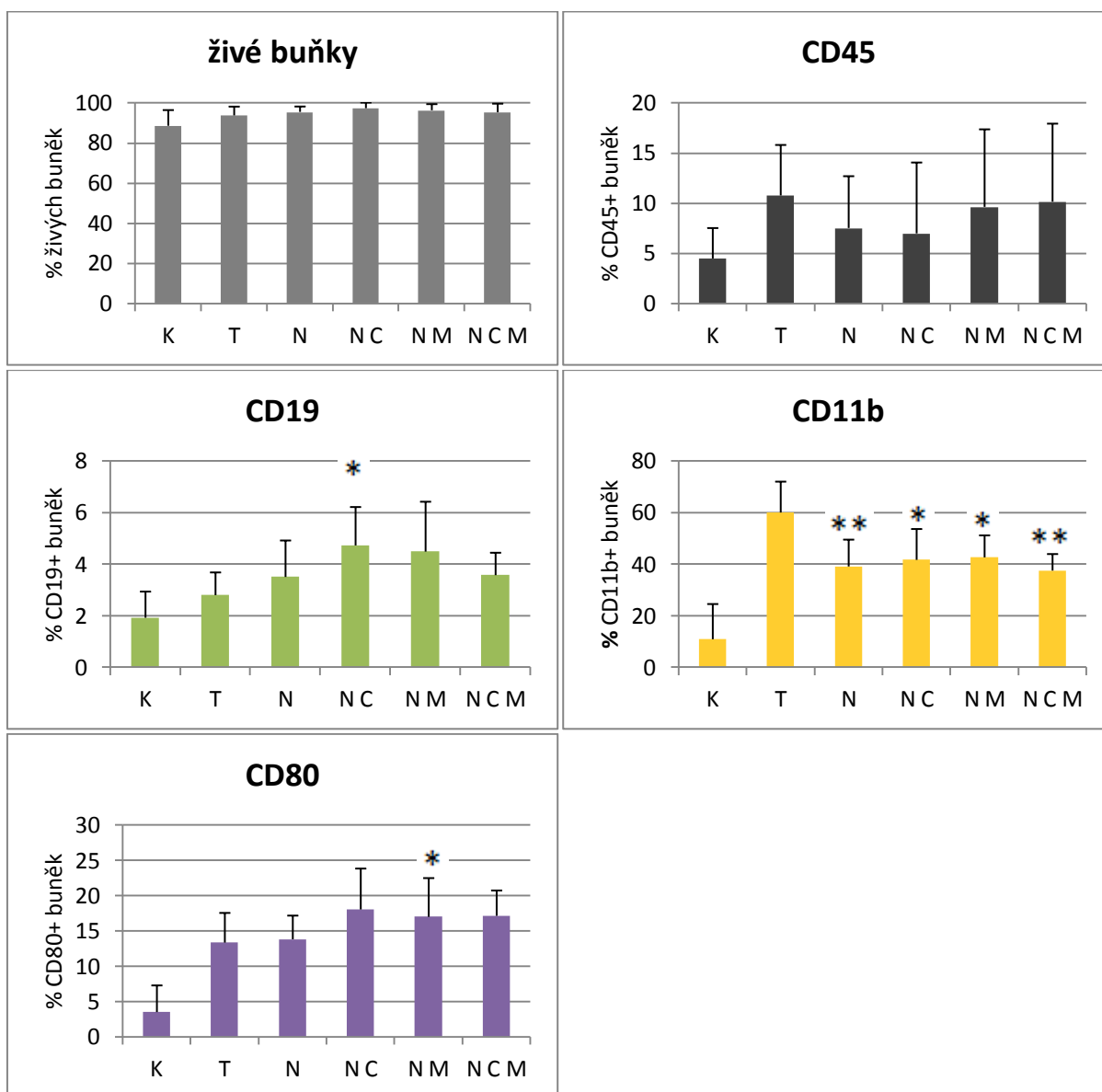
6.4 Analýza lokální imunitní odpovědi

Pro výzkum vlivu transplantace kožního štěpu a různých variant terapie na lokální imunitu byl vybrán šestý den od transplantace. Analýza byla provedena pomocí průtokové cytometrie, PCR a stanovení produkce NO makrofágy. Pro tyto testy již byly začleněny i varianty terapie zahrnující nanovláknenné nosiče s inkorporovaným CsA. Porovnávány byly tyto možnosti: kožní alotransplantát (T), kožní alotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem (N), kožní alotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem s inkorporovaným CsA (N C), kožní alotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem s adherovanými MSC (N M), kožní alotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem s inkorporovaným CsA s adherovanými MSC (N C M). Jako kontrolní byla používána netransplantovaná kůže (K).

6.4.1 Průtoková cytometrie

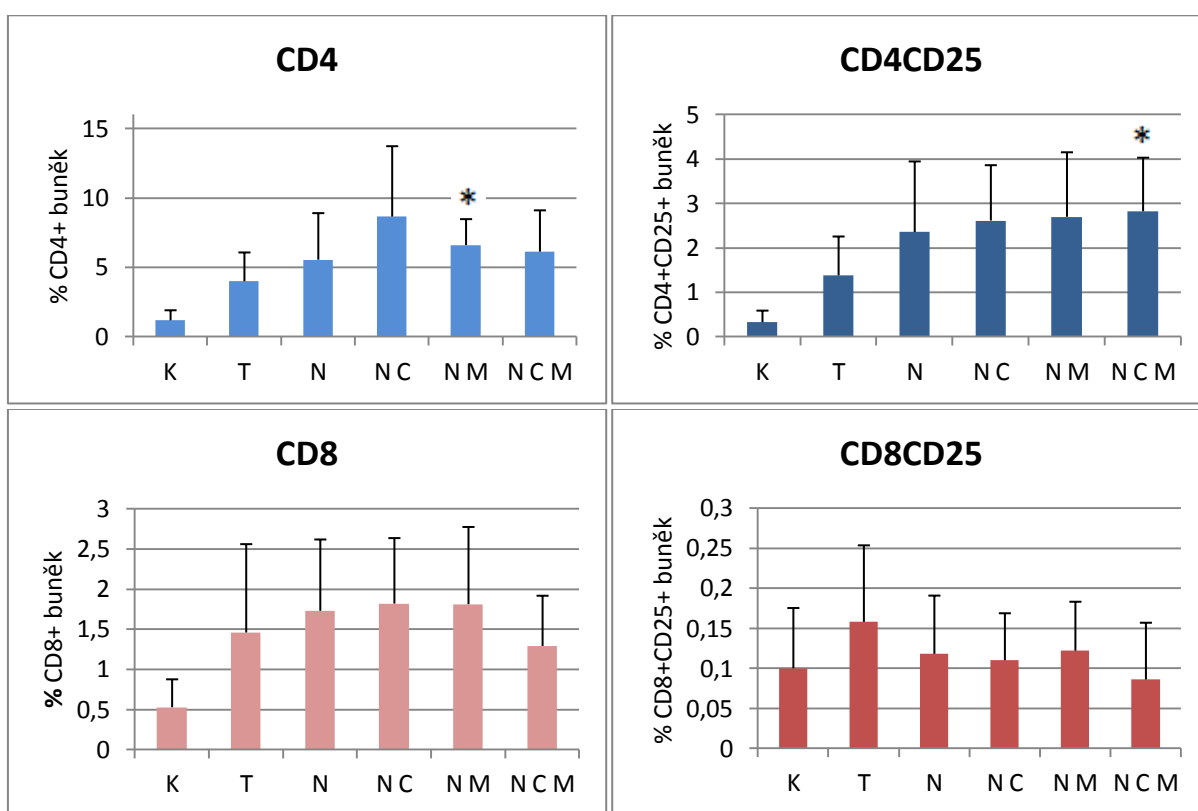
Prostřednictvím FACS analýzy bylo určováno relativní zastoupení imunitních buněk respektive jejich skupin v suspenzích buněk získaných z kožních štěpů. Pro tuto sérii pokusů byly zvoleny protilátky proti povrchovým znakům CD4 pro Th lymfocyty, CD8 pro Tc lymfocyty a současně ještě CD25 pro aktivované lymfocyty. Dále byly používány protilátky proti znakům CD11b pro makrofágy, monocyty, NK buňky, CD19 pro B buňky a CD80 pro aktivované antigen prezentující buňky. Všechny suspenze buněk ze štěpů byly porovnávány i z hlediska zastoupení mrtvých buněk a celkového zastoupení leukocytů.

Výsledky ukazují, že počet živých buněk v suspenzích z kožních transplantátů byl u všech vzorků srovnatelný (obr. 19). Procentuální zastoupení CD45 pozitivních leukocytů bylo nejvyšší u neléčených myší s transplantátem a u myší léčených pomocí nanovláknenných nosičů s adherovanými MSC. Výrazné rozdíly bylo možno pozorovat v zastoupení CD11b pozitivních buněk. Po transplantaci bylo množství CD11b pozitivních buněk největší, u všech myší léčených je jejich počet snížený, přičemž nejnižší je u myší léčených pomocí nanovláknenných nosičů s inkorporovaným CsA a s adherovanými MSC. Celkově CD11b pozitivní buňky tvoří nejpočetnější populaci z leukocytů v kožním transplantátu. U CD19 pozitivních B lymfocytů bylo oproti léčené myši s transplantátem pozorováno zvýšení jejich procentuálního zastoupení u léčených myší, u myší léčených pomocí nanovláknenných nosičů s inkorporovaným CsA a s adherovanými MSC počet mírně poklesl. Podobná tendence byla pozorována i pro CD80 pozitivní buňky.



Obrázek 19. Relativní zastoupení buněčných populací leukocytů v kožních štěpech. Obrázek znázorňuje data získaná FACS analýzou suspenzí buněk z kožních transplantátů. K – netransplantovaná kůže, T – kožní allotransplantát, N – kožní allotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem, N C – kožní allotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem s inkorporovaným CsA, N M – kožní allotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem s adherovanými MSC, N C M – kožní allotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem s inkorporovaným CsA a s adherovanými MSC. Data představují průměry + SD ze šesti nezávislých pokusů (tzn. celkem šest myši pro každou variantu terapie) (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ oproti kožnímu allotransplantátu).

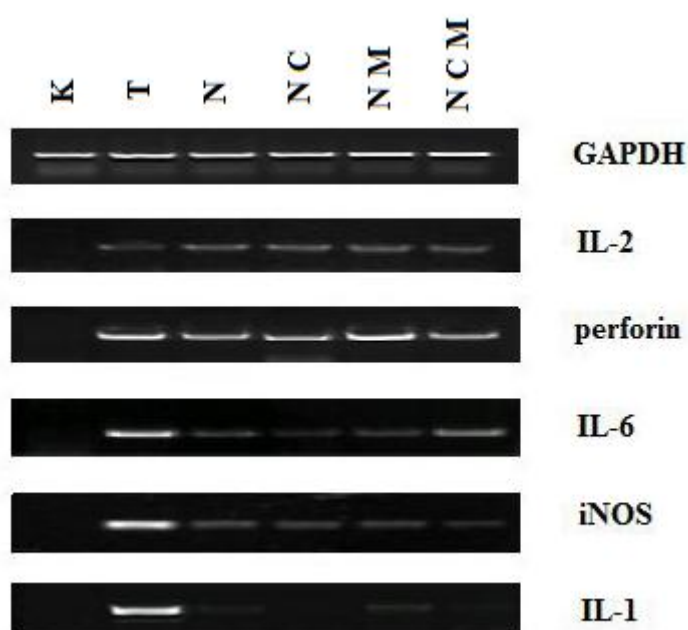
Na obrázku 20 je graficky znázorněno procentuální zastoupení subpopulací T lymfocytů. Počet CD4CD25 pozitivních Th buněk byl vyšší u léčených myši než u neléčených myši s transplantátem, přičemž inhibiční efekt aplikovaných MSC byl patrný pouze pro CD4 pozitivní buňky. Dále je možné sledovat navýšení počtu CD8CD25 pozitivních buněk u myši po transplantaci kožního štěpu a postupné snižování u jednotlivých variant terapie, nejnižší je pak u myši léčených pomocí nanovláknenných nosičů s inkorporovaným CsA a s adherovanými MSC. U CD8 pozitivních buněk nebyly pozorovatelné výrazné rozdíly, mírný pokles byl zaznamenán jen u myši léčené pomocí nanovláknenných nosičů s inkorporovaným CsA a s adherovanými MSC.



Obrázek 20. Relativní zastoupení subpopulací T lymfocytů v kožních štěpech. Obrázek názorňuje data získaná FACS analýzou suspenzí buněk z kožních transplantátů. K – netransplantovaná kůže, T – kožní alotransplantát, N – kožní alotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem, NC – kožní alotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem s inkorporovaným CsA, NM – kožní alotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem s adherovanými MSC, NCM – kožní alotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem s inkorporovaným CsA a s adherovanými MSC. Data představují průměry + SD ze šesti nezávislých pokusů (tzn. celkem šest myši pro každou variantu terapie) (*P ≤ 0,05 oproti kožnímu alotransplantátu).

6.4.2 Exprese genů pro prozánětlivé cytokiny

Kožní transplantát byl po odběru podroben analýze pomocí PCR. Na obrázku 21 je vidět, že exprese genů pro některé proteiny, jako je například IL-2 nebo perforin, se v rámci jednotlivých variant terapie nemění. U jiných, především prozánětlivých cytokinů jako IL-1 a IL-6 lze pozorovat výrazné zvýšení jejich exprese u neléčené myši s transplantátem a snížení u všech variant terapie. Podobný trend je možné sledovat také pro enzym iNOS.

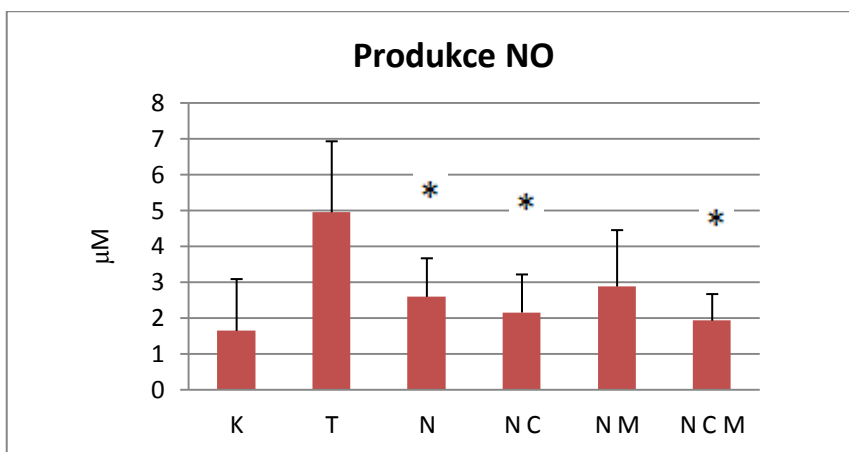


Obrázek 21. Exprese genů pro cytokiny a jiné proteiny účastníci se zánětlivé odhojovací reakce.

Pomocí PCR byl porovnáván vliv jednotlivých variant terapie na expresi genů pro cytokiny IL-1, IL-2, IL-6, enzymu iNOS a perforinu přímo v tkáni kožního transplantátu. Jako kontrola byla sledována exprese genu pro GAPDH (glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza). K – netransplantovaná kůže, T – kožní alotransplantát, N – kožní alotransplantát překrytý nanovlákněným nosičem, N C – kožní alotransplantát překrytý nanovlákněným nosičem s inkorporovaným CsA, N M – kožní alotransplantát překrytý nanovlákněným nosičem s adheřovanými MSC, N C M – kožní alotransplantát překrytý nanovlákněným nosičem s inkorporovaným CsA a s adheřovanými MSC. Data ukazují jeden reprezentativní pokus ze tří nezávislých opakování.

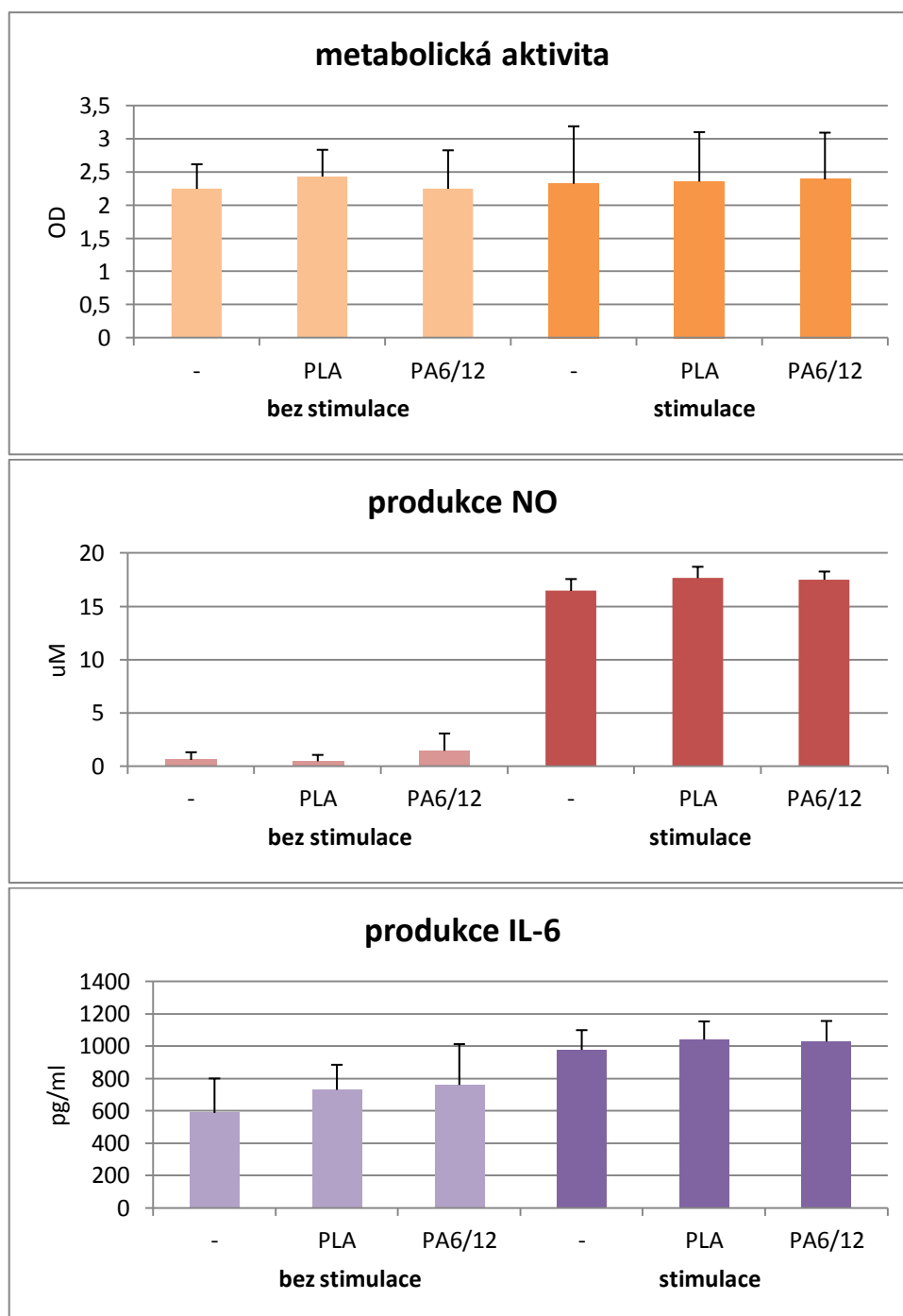
6.4.3 Změny produkce NO makrofágy v kožním transplantátu vlivem terapie

Zánětlivá imunitní odpověď na kožní transplantát byla stanovena pomocí testu produkce NO makrofágy přítomnými v této tkáni. Z obrázku 22 je zřejmé, že v kožním štěpu odebraném z neléčené myši s transplantátem dochází k významné produkci NO. U všech ostatních variant terapie byla pozorována mnohem nižší hladina NO, přičemž nejmenší byla u myší, kterým bylo na transplantát přiloženo nanovlákn s inkorporovaným CsA a s adherovanými MSC.



Obrázek 22. Stanovení produkce NO makrofágy v kožním štěpu. Prostřednictvím Griessovy reakce byl porovnáván vliv jednotlivých variant terapie na produkci NO makrofágy z kožních transplantátů. K – netransplantovaná kůže, T – kožní alotransplantát, N – kožní alotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem, N C – kožní alotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem s inkorporovaným CsA, N M – kožní alotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem s adherovanými MSC, N C M – kožní alotransplantát překrytý nanovláknenným nosičem s inkorporovaným CsA a s adherovanými MSC. Data představují průměry + SD ze šesti nezávislých pokusů (tzn. celkem šest myší pro každou variantu terapie) (* $P \leq 0,05$ oproti kožnímu alotransplantátu).

Na základě výsledků, které ukázaly snížený počet CD11b pozitivních buněk, sníženou expresi pro enzym iNOS a signifikantně sníženou produkci NO makrofágy z kožního štěpu, jsme dále testovali, zda tento efekt není způsoben negativním vlivem nanovláknenných nosičů na makrofágy. Byly proto provedeny analogické testy jako u detekce vlivu nanovláken na MSC. S využitím testu metabolické aktivity a detekce produkce NO a IL-6 byl porovnáván vliv nanovláknenných nosičů na peritoneální makrofágy. Byla použita nanovlákn z polymeru PLA a pro kontrolu i z PA6/12. Výsledky ukazují, že nanovláknenné nosiče nemají toxický vliv na makrofágy (obr. 23).



Obrázek 23. Vliv nanovláknenných nosičů na viabilitu makrofágů a jejich produkci NO a IL-6.

Makrofágy nestimulované nebo stimulované pomocí LPS a IFN- γ byly kultivovány samostatně (-) nebo v přítomnosti nanovláknenných nosičů (PLA / PA6/12). Metabolická aktivita makrofágů byla detekována pomocí přeměny substrátu WST-1 na barevný produkt a měřena spektrofotometricky. Produkce NO byla určena pomocí Griessovy reakce ze supernatantů a měřena spektrofotometricky. Ze supernatantů byl stanoven i obsah IL-6 pomocí ELISA testu. Data představují průměry + SD z pěti nezávislých pokusů, nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl od kontrolních vzorků. PA6/12, PLA-nanovláknenné nosiče.

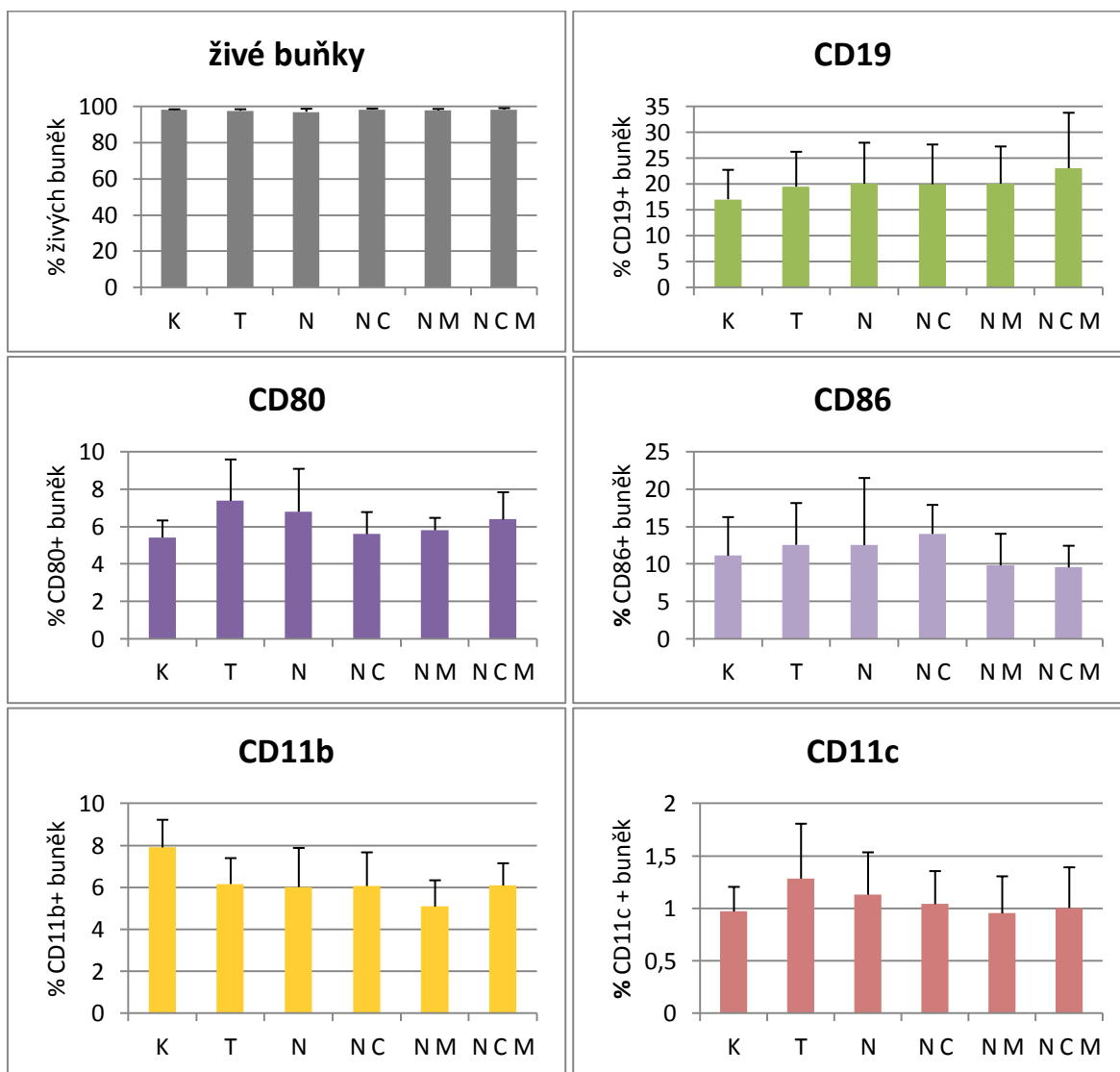
6.5 Analýza systémové imunitní odpovědi

Aby byl výzkum komplexní, byl proveden také rozbor systémové imunitní odpovědi na transplataci a následnou terapii. Analýza byla provedena pomocí průtokové cytometrie, ELISA testu a detekce produkce NO makrofágy. Stejně jako u detekce lokální imunitní odpovědi byl i zde vybrán šestý den od transplantace. Porovnávány byly také stejné varianty terapie: neléčené myši s alotransplantátem (T), myši s alotransplantátem překrytým nanovlákněným nosičem (N), myši s alotransplantátem překrytým nanovlákněným nosičem s inkorporovaným CsA (N C), myši s alotransplantátem překrytým nanovlákněným nosičem s adhezaními MSC (N M), myši s alotransplantátem překrytým nanovlákněným nosičem s inkorporovaným CsA a s adhezaními MSC (N C M). Jako kontrolní byly použity zdravé myši bez transplantátu.

6.5.1 Průtoková cytometrie

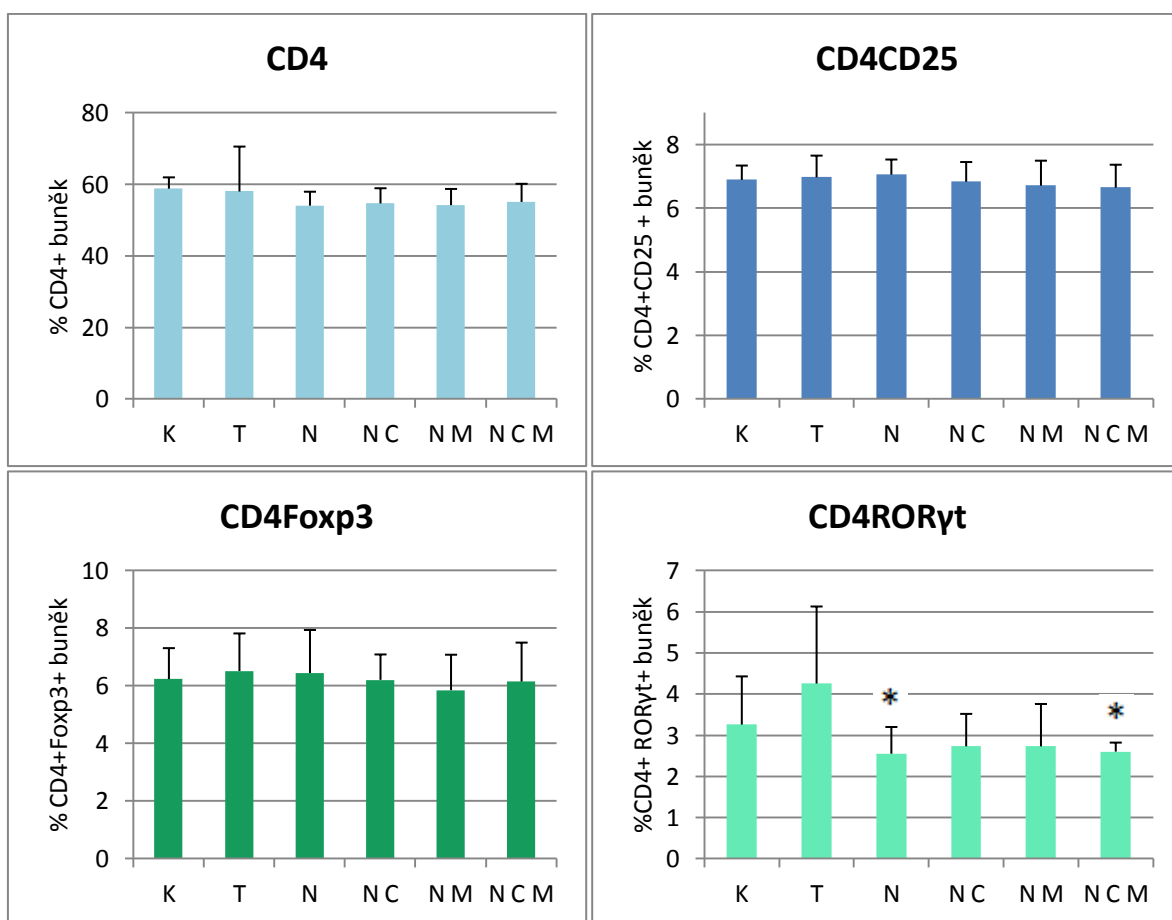
Prostřednictvím FACS analýzy bylo testováno relativní zastoupení jednotlivých populací imunitních buněk v suspenzích buněk ze slezin a uzlin myši. Pro tuto sérii pokusů byly vybrány protilátky proti povrchovým znakům CD4 pro Th lymfocyty, CD8 pro Tc lymfocyty a současně ještě aktivační znak CD25 a časný aktivační znak CD69 pro aktivované lymfocyty. Dále byly používány protilátky proti znakům CD11b pro makrofágy, monocyty, NK buňky, CD19 pro B buňky a CD80, CD86 a CD11c pro antigen prezentující buňky. Byly detekovány i transkripční faktory ROR γ t pro Th17 lymfocyty a Foxp3 pro Treg buňky. Všechny suspenze buněk z lymfatických uzlin byly porovnávány i z hlediska zastoupení mrtvých buněk. Na obrázcích 24, 25, a 26 jsou graficky znázorněny výsledky. Jak je vidět na obrázku 24, počet živých buněk byl ve všech suspenzích srovnatelný, vždy se pohyboval okolo 98 %. U CD19 pozitivních B buněk byl pozorován mírný nárůst jejich procentuálního zastoupení ve vzorcích z myši léčených pomocí nanovlákněných nosičů a u myši léčených pomocí nanovlákněných nosičů s inkorporovaným CsA a s adhezaními MSC. Dále byl pozorován vyšší počet CD80 a CD86 pozitivních buněk ve vzorcích z neléčených myši s transplantátem a myši léčených pouze nanovlákněnými nosiči. U myši léčených pomocí nanovlákněných nosičů s adhezaními MSC se počet buněk exprimujících tyto kostimulační molekuly snížil (obr. 24). Relativní zastoupení CD11b pozitivních buněk bylo nejvyšší u kontrolních myši a u všech ostatních variant terapie bylo pozorováno snížení. CD11c

pozitivní buňky tvořily jen malou část z celé suspenze a jejich relativní buněčná zastoupení v jednotlivých vzorcích mají podobný trend jako CD80 pozitivní buňky. Nejvyšší množství CD11c pozitivních buněk bylo pozorováno u neléčených myší s transplantátem, u myší léčených se snížilo, přičemž nejmenší bylo u myší léčených pomocí nanovláknenných nosičů s adherovanými MSC.



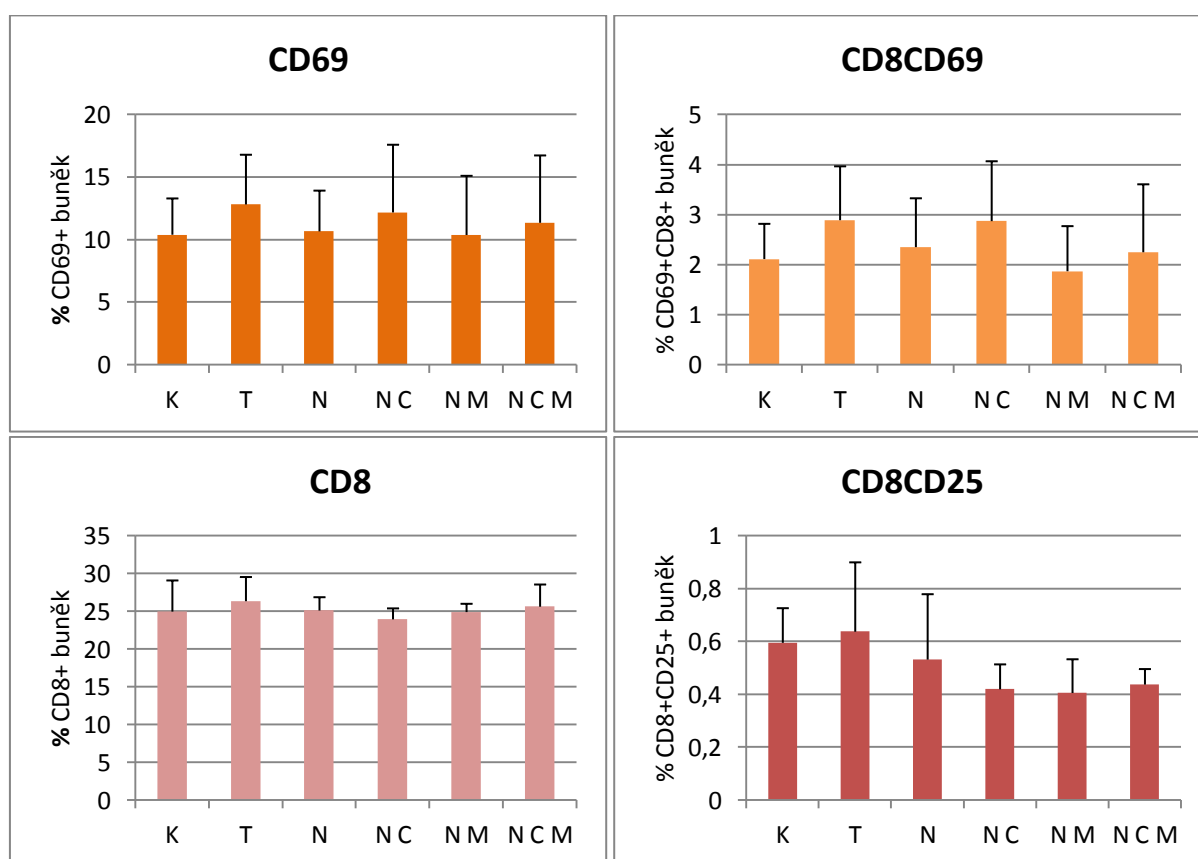
Obrázek 24. Relativní zastoupení různých populací leukocytů v lymfatických uzlinách. Obrázek znázorňuje data získaná FACS analýzou suspenzí z lymfatických uzlin myší. K – LNC kontrolní zdravé myši, T – LNC neléčené myši s alotransplantátem, N – LNC myši s alotransplantátem překrytým nanovláknenným nosičem, NC – LNC myši s alotransplantátem překrytým nanovláknenným nosičem s inkorporovaným CsA, NM – LNC myši s alotransplantátem překrytým nanovláknenným nosičem s adherovanými MSC, NCM – LNC myši s alotransplantátem překrytým nanovláknenným nosičem s inkorporovaným CsA a s adherovanými MSC. Data představují průměry + SD z osmi nezávislých pokusů (tzn. celkem osm myší pro každou variantu terapie).

Na obrázku 25 je znázorněno procentuální zastoupení subpopulací CD4 pozitivních T buněk v lymfatických uzlinách. Výsledky ukázaly, že počet CD4 ani CD4CD25 pozitivních T lymfocytů se v rámci jednotlivých skupin myši významně neměnil. Podobně nebyly pozorovány výrazné změny pro populaci CD4Foxp3 pozitivních leukocytů. U CD4RORγt pozitivních Th17 buněk bylo pozorováno zvýšení jejich počtu ve vzorcích z neléčených myši s transplantátem, u všech ostatních variant terapie byl počet CD4RORγt pozitivních Th17 buněk nižší.



Obrázek 25. Relativní zastoupení subpopulací T lymfocytů v lymfatických uzlinách. Obrázek znázorňuje data získaná FACS analýzou suspenzí z lymfatických uzlin myši. K – LNC kontrolní zdravé myši, T – LNC neléčené myši s alotransplantátem, N – LNC myši s alotransplantátem překrytým nanovlákněným nosičem, NC – LNC myši s alotransplantátem překrytým nanovlákněným nosičem s inkorporovaným CsA, NM – LNC myši s alotransplantátem překrytým nanovlákněným nosičem s adhezerovanými MSC, NCM – LNC myši s alotransplantátem překrytým nanovlákněným nosičem s inkorporovaným CsA a s adhezerovanými MSC. Data představují průměry + SD z osmi nezávislých pokusů (tzn. celkem osm myši pro každou variantu terapie) (* $P \leq 0,05$ oproti neléčené myši s alotransplantátem).

Obrázek 26 znázorňuje relativní zastoupení CD8 pozitivních Tc lymfocytů v kombinaci s aktivačními znaky lymfocytů CD69 a CD25. Je patrné, že počet CD69 pozitivních buněk se po transplantaci zvýšil, u myši léčených pomocí nanovláknenných nosičů s adherovanými MSC došlo ke snížení. Podobný trend je pozorovatelný pro CD8CD69 pozitivní lymfocyty, ale jejich procentuální zastoupení je celkově menší než zastoupení všech CD69 pozitivních buněk. U CD8CD25 pozitivních Tc lymfocytů bylo pozorováno zvýšení jejich počtu ve vzorcích z neléčených myši s transplantátem a snížení u myši léčených.

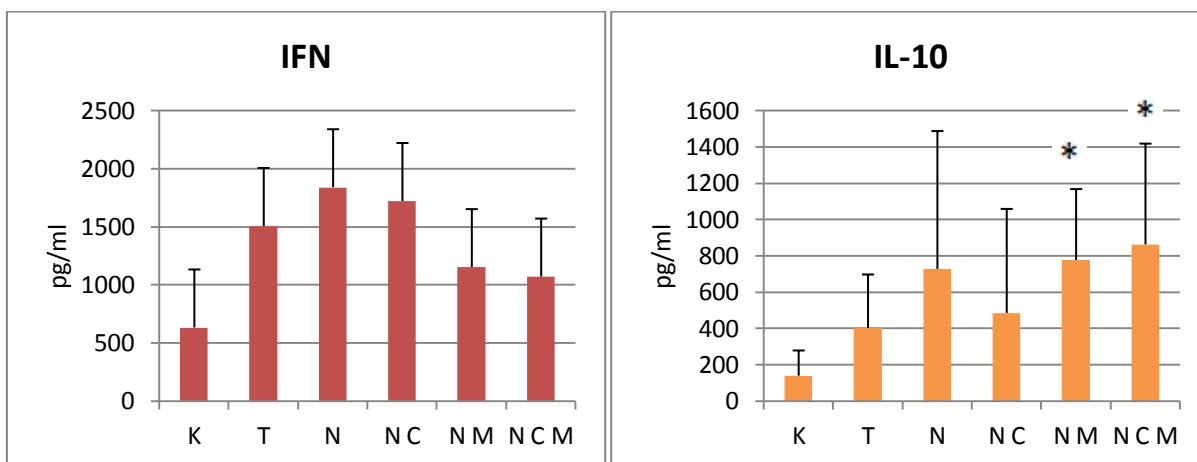


Obrázek 26. Relativní zastoupení subpopulací leukocytů v lymfatických uzlinách. Obrázek znázorňuje data získaná FACS analýzou suspenzí buněk z lymfatických uzlin myši. K – LNC kontrolní zdravé myši, T – LNC neléčené myši s alotransplantátem, N – LNC myši s alotransplantátem překrytým nanovláknenným nosičem, N C – LNC myši alotransplantátem překrytým nanovláknenným nosičem s inkorporovaným CsA, N M – LNC myši s alotransplantátem překrytým nanovláknenným nosičem s adherovanými MSC, N C M – LNC myši s alotransplantátem překrytým nanovláknenným nosičem s inkorporovaným CsA a s adherovanými MSC. Data představují průměry + SD z osmi nezávislých pokusů (tzn. celkem osm myši pro každou variantu terapie).

6.5.2 Vliv jednotlivých variant terapie na produkci cytokinů buňkami lymfatických uzlin

Pro porovnání produkce cytokinů pomocí ELISA testu byly použity suspenze buněk z lymfatických uzlin myší. Vzorky byly odebírány z myší kontrolních bez transplantátu, neléčených myší s transplantátem i všech myší léčených různými variantami terapie. LNC byly v kultuře stimulovány ozářenými splenocyty myši kmene C57BL/6. Vzorky byly odebírány v různých intervalech optimálních pro jednotlivé cytokiny: pro IFN- γ 72 hodin a pro IL-10 96 hodin.

Následující grafy zobrazují výsledky ELISA testu (obr. 27). Z obrázků je zřejmé, že nanovlákná s adherovanými MSC výrazně snižují produkci prozánětlivého cytokinu IFN- γ . Opačný efekt lze sledovat pro produkci imunosupresivního IL-10. Zatímco u neléčených myší s transplantovaným štěpem byla jeho produkce nízká, u myší, kterým byla podána nanovlákná, nebo nanovlákná s adherovanými MSC a s CsA, nebo bez něj, se produkce IL-10 zvýšila.

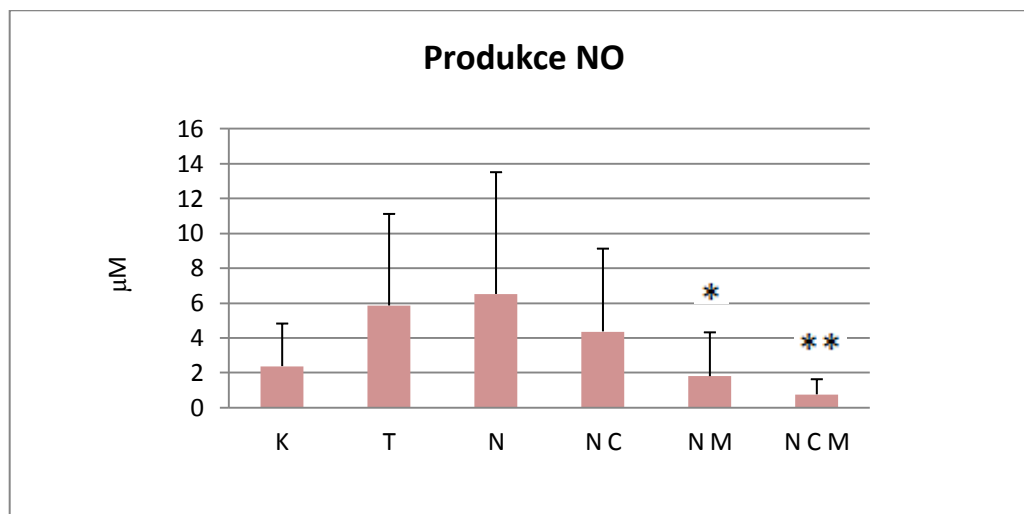


Obr. 27. Vliv jednotlivých variant terapie na produkci cytokinů buňkami lymfatických uzlin.

Pomocí ELISA testu byl porovnáván vliv jednotlivých variant terapie na produkci cytokinů IL-10 a IFN- γ buňkami lymfatických uzlin. K – LNC kontrolní zdravé myši, T – LNC neléčené myši s alotransplantátem, N – LNC myši s alotransplantátem překrytým nanovláknenným nosičem, NC – LNC myši s alotransplantátem překrytým nanovláknenným nosičem s inkorporovaným CsA, NM – LNC myši s alotransplantátem překrytým nanovláknenným nosičem s adherovanými MSC, NCM – LNC myši s alotransplantátem překrytým nanovláknenným nosičem s inkorporovaným CsA a s adherovanými MSC. Data představují průměry + SD ze šesti nezávislých pokusů (tzn. celkem šest myší pro každou variantu terapie) (* $P \leq 0,05$ oproti neléčené myši s alotransplantátem).

6.5.3 Detekce zánětlivých faktorů pomocí stimulace makrofágů

Pro porovnání přítomnosti prozánětlivých faktorů v kulturách suspenzí LNC různě léčených myší byla použita také další, nepřímá metoda. K aloantigenem stimulovaným suspenzím z uzlin byly přidány čerstvě vypláchnuté peritoneální makrofágy. Ze supernatantů pak byla určována produkce NO v těchto směsných kulturách. Na obrázku 28 je vidět, že produkce NO byla největší v kulturách z uzlin myší po transplantaci či myší léčených pouze pomocí nanovláknenných nosičů. U ostatních variant terapie byla pozorována nižší koncentrace NO, přičemž nejnižší byla u myší, kterým byly kromě nanovláknenných nosičů s inkorporovaným CsA aplikovány ještě MSC adherované na nanovlákně.



Obrázek 28. Produkce NO makrofágy z kontrolních myší kultivovaných v přítomnosti LNC.

Přítomnost prozánětlivých molekul produkovaných LNC po stimulaci ozářenými splenocyty myší kmene C57BL/6 byla detekována nepřímo, pomocí produkce NO makrofágy přidány do kultury buněk. K – LNC kontrolní zdravé myši, T – LNC neléčené myši s alotransplantátem, N – LNC myši s alotransplantátem překrytým nanovláknenným nosičem, N C – LNC myši alotransplantátem překrytým nanovláknenným nosičem s inkorporovaným CsA, N M – LNC myši s alotransplantátem překrytým nanovláknenným nosičem s adherovanými MSC, N C M – LNC myši s alotransplantátem překrytým nanovláknenným nosičem s inkorporovaným CsA a s adherovanými MSC. Data představují průměry + SD ze šesti nezávislých pokusů (tzn. celkem šest myší pro každou variantu terapie)

(* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ oproti neléčené myši s alotransplantátem).

7 Diskuse

V současné době existuje při léčbě kožních defektů řada přístupů zahrnujících využití xenotransplantátů, amniové membrány, syntetických membrán či nanovláknenných materiálů (Sheridan and Tompkins 1999). Mezi možnosti léčby kožních poranění se řadí i náhrada poškozené tkáně pomocí transplantace. Tento postup je však spojen s mnoha problémy souvisejícími se silnou transplantační reakcí a navozením tolerance. V současnosti studovanou terapeutickou alternativou je aplikace MSC, které mají díky svým unikátním imunomodulačním a diferenciačním schopnostem potenciál podporovat regeneraci poškozené tkáně. Sbano et al. (2008) ve svých experimentech zabývajících se transplantací kožního štěpu poukázali na výhodnost intravenózní aplikace MSC společně s CsA, která prodlouží dobu přežití transplantátu. Výzkumy prokazují, že lokální aplikace MSC pomocí amniové membrány je výhodnější než systémové podání těchto buněk (Kim et al. 2009).

V naší studii jsme na myším modelu sledovali systémovou i lokální imunitní reakci po transplantaci alogenního kožního štěpu a porovnávali různé varianty terapie, přičemž jsme se pokusili kombinovat výhody výše zmíněných přístupů. Testovali jsme vliv nanovláknenných nosičů bez CsA nebo s inkorporovaným CsA, a imunoregulační vlastnosti lokálně aplikovaných MSC. Tato práce navazuje na předchozí výzkumy v naší laboratoři, kdy bylo prokázáno, že je možné připravit nanovláknena s inkorporovaným CsA, aniž by se změnila vlastnosti nanovláken a farmakologická účinnost CsA, a že tato vlákna v závislosti na podmínkách po aplikaci uvolňují imunosupresivum lokálně po dobu několika dní (Holář et al. 2011). Přesné zacílení a lokální podání by v klinické praxi mohlo umožnit podávání nižších dávek imunosupresivních látek a tím snížit jejich nežádoucí účinky pro pacienty.

Existuje řada prací, které se zabývají problematikou využití nanovláknenných materiálů v regenerativní medicíně a jejich osazení buňkami (např. Chong et al. 2007, Kumbar et al. 2008). Bylo prokázáno, že nanovláknenné nosiče tvoří pro kultivaci a proliferaci kmenových buněk vhodné prostředí napodobující extracelulární matrix a že lze buňky pomocí těchto nosičů cíleně aplikovat na potřebné místo (Ozawa et al. 2002, Rim et al. 2009). Zajícová et al. (2010) prokázali, že na nanovláknenných nosičích je možné kultivovat a přenášet také MSC, aniž by se tím změnila viabilita či morfologie těchto kmenových buněk. Abychom mohli v návaznosti na tyto práce testovat terapeutický vliv nanovláknenných nosičů s adherovanými MSC při léčbě transplantace kožního štěpu, bylo nutné ověřit, zda nemají toxický vliv na MCS. Sérií in vitro pokusů jsme prokázali, že nanovláknena nemají vliv na metabolickou

aktivitu MSC a neovlivňují ani jejich produkci IL-6 a NO. Testovali jsme ze dvou různých druhů polymerů, PA6/12 a PLA. Lepší výsledky byly dosaženy s použitím PLA a pro všechny další testy byl tedy používán tento polymer.

Migrace aplikovaných MSC. Bylo popsáno, že MSC po intravenózní aplikaci migrují přednostně do místa poranění, ale je možné je nalézt i v lymfatických tkáních a v plicích (Jones et al. 2008). Abychom migrační schopnosti MSC potvrdili i v našem modelu, kdy jsme MSC aplikovali pomocí nanovláknenných nosičů přímo na poraněné místo, provedli jsme několik pokusů, při kterých byly myším podány fluorescenčně značené MSC. Zjistili jsme, že MSC nezůstávají na nanovláknenných nosičích, ale že aktivně migrují nejen do zánětlivé oblasti kožního transplantátu ale i do lymfatických uzlin a sleziny. Po šesti dnech tvoří MSC přibližně 6 % buněk v suspenzi z kožního štěpu a 1% buněk v suspenzích ze sleziny a lymfatických uzlin. V transplantované tkáni představovaly MSC poměrově mnohem více buněk než v lymfatických tkáních, bylo tedy možné předpokládat, že ovlivněna bude i systémová imunitní odpověď, ale mnohem větší přínos terapie byl očekáván pro lokální imunitní reakci.

Analýza lokální imunitní odpovědi. K odhojení kožního allotransplantátu při použití kmenů C57BL/6 a BALB/c dochází mezi 10. až 12. dnem. Pomocí histologických řezů transplantátů jsme zjistili, že 2. a 4. den po transplantaci nejsou pozorovatelné výrazné změny v morfologii tkáně, zatímco po 8. až 10. dni od transplantace byla tkáň už značně deformovaná vlivem zánětlivé reakce, oddělovala se epidermis a byla patrná vysoká infiltrace buněk. S tím korelovaly i výsledky FACS analýzy, kdy počet leukocytů v suspenzích ze štěpů byl velmi nízký po dvou a čtyřech dnech a vysoký po deseti dnech. Vzhledem k tomu, že naším cílem bylo porovnávat vliv jednotlivých terapií na imunitní reakci probíhající po transplantaci kožního štěpu, vybrali jsme pro další testy šestý den, kdy je imunitní odpověď již rozvinutá, ale ještě je možné dobře pozorovat rozdíly v morfologii štěpů, tkáň je kompaktní a je možné z ní izolovat dostatek buněk pro FACS analýzu. Sledovali jsme lokální imunitní odpověď po transplantaci a její změny při různých variantách terapie využívajících CsA inkorporovaný v nanovláknenných nosičích, MSC adherované na tyto nosiče, případně kombinace těchto přístupů. Jako kontrolní vzorek byla využívána netransplantovaná kůže.

Pomocí FACS analýzy suspenzí buněk z kožních štěpů se nám podařilo potvrdit změny v zastoupení různých buněčných populací vlivem MSC pro CD11b pozitivní buňky, pro CD19 pozitivní B lymfocyty, CD4, CD8 a CD8CD25 pozitivní T lymfocyty, což

odpovídá poznání, že MSC působí antiproliferativně na T lymfocyty (Aggarwal and Pittenger 2005, Glennie et al. 2005), mění proliferaci a migrační schopnosti B lymfocytů (Corcione et al. 2006) a podílí se i na regulaci aktivity dalších leukocytů jako jsou makrofágy (Othaki et al. 2008) nebo NK buňky (Selmani et al. 2008). Jelikož CD11b pozitivní buňky tvoří nejpočetnější skupinu všech CD45 pozitivních imunitních buněk ve štěpu, lze předpokládat, že se velkou měrou podílí na odhojovací reakci a její regulaci (to odpovídá již dříve publikovaným výsledkům – Krulová et al. 2002). Sbano et al. (2008) popsali, že větší účinek má terapie kombinující CsA a MSC než jen podání samotných MSC či samotného CsA. Tento synergický efekt dvou terapií jsme pozorovali u snížení počtu CD8 a CD8CD25 pozitivních buněk. Zajímavé změny jsme pozorovali i v zastoupení CD19 pozitivních B lymfocytů. Jejich počet byl u všech léčených myši vyšší než u neléčené myši s transplantátem, což nasvědčuje tomu, že B lymfocyty migrují do kožního transplantátu více, pokud je na něj přiloženo nanovláknko. Z toho vyplývá, že nanovláknenné nosiče mohou u některých populací leukocytů vyvolat větší reakci než samotný štěp. Vzhledem k tomu, že B lymfocyty mohou vyvolat rejekci štěpu, je třeba dále potvrdit, o jakou subpopulaci B lymfocytů se jedná. Annaick et al. 2010 ukázali, že pacienti, u kterých nedochází k rejekci transplantované ledviny, přestože nejsou léčeni imunosupresivními léky, mají velké množství periferních B lymfocytů. Dále bylo zjištěno, že pomocí mAb proti CD45RB lze u B lymfocytů vyvolat regulační fenotyp důležitý pro transplantační toleranci (Zhao et al. 2010). Je možné, že pomocí MSC lze indukovat regulační B lymfocyty a pak by se tato subpopulace leukocytů ve štěpu mohla podílet na udržení dlouhodobé tolerance k transplantátu. Počet CD4CD25 pozitivních – tedy aktivovaných Th lymfocytů byl u všech variant terapie vyrovnaný, u myši léčených pomocí nanovláken s adherovanými MSC dokonce mírně stoupl. Protože je známo, že MSC mají schopnost indukovat diferenciaci CD4CD25Foxp3 pozitivních Treg lymfocytů (např. Maccario et al. 2005, Selmani et al. 2008, Svobodová et al. 2011), rozhodli jsme se ověřit, zda je možné, že v našem modelu transplantace kožního štěpu a následné terapie zvyšují MSC podíl Treg v transplantátu. Ukázalo se však, že těchto buněk není pro relevantní FACS analýzu v suspenzích z transplantátů dostatek. Z toho důvodu nejsou získaná data prezentována ve výsledkové části. Nicméně zjištění, jaká populace CD4CD25 buněk je po terapii pomocí nanovláken zvýšena, je důležité a bude předmětem dalšího výzkumu zaměřeného na potlačení rejekční reakce. Poměrně početnou skupinu tvořily CD80 pozitivní buňky. Jejich procentuální zastoupení se vlivem léčby naopak zvyšovalo, což poukazuje na fakt, že cílená terapie pomocí CsA a MSC brání migraci těchto antigen prezentujících buněk z místa poranění, nebo je sem dokonce atrahuje. CD80 pozitivní buňky

vykazovaly podobný trend jako CD19 pozitivní B lmfocyty, z toho je možné usuzovat, že část CD80 pozitivních buněk tvoří aktivované B lmfocyty.

Imunitní odpověď na transplantaci a vliv následné terapie jsme porovnávali také pomocí PCR na úrovni exprese různých genů. U některých molekul, jako je IL-2 nebo perforin, nebyly pozorovány žádné změny v rámci všech experimentálních skupin myší. Výrazné rozdíly jsme ale detekovali u genů pro prozánětlivé cytokiny IL-6 a IL-1, u obou proteinů bylo možné pozorovat zvýšení exprese jejich genů u neléčených myší s transplantátem a naopak potlačení exprese u všech variant terapie. Stejně tomu bylo i pro enzym iNOS syntetizující NO, který je možné považovat za prozánětlivou molekulu podílející se velkou měrou na odhojení kožního transplantátu (Krulová et al. 2002). Jelikož jsou tyto tři naposledy jmenované molekuly spojené s makrofágy, rozhodli jsme se ověřit přítomnost aktivovaných makrofágů ve štěpech další metodou – detekcí produkce NO přímo makrofágy přítomnými v tkáni kožního transplantátu. Maggini et al. (2010) pozorovali, že MSC inhibují u makrofágů produkci prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-6, IL-12 a IFN- γ a naopak stimulují produkci protizánětlivého IL-10. Prokázali jsme, že vlivem všech terapií dochází ke snížení produkce NO makrofágy, přičemž nejmenší je u myší léčených pomocí nanovláknenných nosičů s inkorporovaným CsA a adherovanými MSC. Z toho lze usuzovat, že už samotná aplikace nanovláknenných nosičů může mít vliv na snížení exprese a následnou produkci prozánětlivých faktorů v kožním transplantátu a že tento efekt se ještě zvýší lokálním synergistickým působením MSC a CsA. Dubský et al. (2012) ukázali, že zatímco přiložení želatinových nanovláken na kožní poranění urychlí regenerační procesy v poškozené tkáni, aplikace nanovláken z kaprolaktonu nevykazuje významný léčebný efekt. Naše výsledky ukazují, že terapie založená na aplikaci nanovláknenných nosičů PLA má příznivý vliv na potlačení zánětlivé reakce po transplantaci.

S daty získanými prostřednictvím PCR a Griessovy reakce korelují i výsledky FACS analýzy pro CD11b pozitivní buňky, což je znak charakteristický pro makrofágy. Exprimují ho však i některé subpopulace NK buněk a neutrofilů. Jelikož všechny výsledky naznačují, že v lokální imunitní odpovědi hrají makrofágy jednu z hlavních rolí, rozhodli jsme se potvrdit, že tvoří majoritní část populace CD11b pozitivních buněk ve štěpu. Pomocí mAb protilátky proti molekule F4/80 jsme zjistili, že přibližně 96 % CD11b pozitivních buněk exprimuje oba tyto znaky a lze je označovat za makrofágy.

Pomocí tří nezávislých metod jsme prokázali, že makrofágy se podílí na regulaci a průběhu odhojovací reakce. Aby bylo možné vyloučit, že pozorovaný efekt je způsoben negativním působením nanovláknenných nosičů na makrofágy, provedli jsme další sérii testů.

V in vitro podmínkách jsme nepozorovali žádný efekt nanovláknenných nosičů na viabilitu ani produkci IL-6 a NO makrofágy. Výsledky ukazují, že získaná data nejsou způsobena případnou toxicitou nanovláknenných nosičů pro buňky, ale že se jedná o ovlivnění přítomnosti a funkčnosti makrofágů v místě zánětlivé odhojovací reakce prostřednictvím různých variant terapie. Naše data potvrzují, že MSC nepůsobí jen na DC, T a B lymfocyty, ale jak se v poslední době ukazuje, významné může být i ovlivňování makrofágů a monocytů (Kim and Hamatti 2009, Maggini et al. 2010). Z prezentovaných výsledků vyplývá, že MSC mění jak aktivitu, tak migrační schopnosti makrofágů.

Analýza systémové imunitní odpovědi. Působení různých variant terapie na reakci imunitního systému jsme sledovali i v rámci systémové imunitní odpovědi, kdy jsme se zaměřili na buňky získané ze spádových lymfatických uzlin. Používali jsme stejné varianty terapie jako u detekce lokální imunitní reakce, dále neléčené myši s transplantátem a myši kontrolní, bez transplantované tkáně. Jelikož asi 95 % buněk získaných z lymfatických uzlin je CD45 pozitivních, nebylo nutné používat společně s ostatními protilátkami ještě protilátku proti tomuto znaku. Další výhodou je fakt, že suspenze LNC obsahují mnohem větší počet leukocytů než vzorky z kožních transplantátů, mohli jsme tedy používat větší spektrum protilátek proti povrchovým i intracelulárním znakům. Výsledky FACS analýzy ukazují, že vliv různých způsobů léčby je patrný i u systémové imunitní odpovědi na transplantaci. V mnoha případech jsme pozorovali opačné trendy než u lokální imunitní odpovědi. Příkladem je zastoupení CD11b pozitivních buněk. Na rozdíl od vzorků z kožních štěpů jsme v suspenzích LNC nepozorovali výrazné změny v zastoupení CD11b pozitivních buněk. Mírné navýšení detekované u kontrolních myši může být způsobeno tím, že u operovaných myši tyto buňky pod vlivem prozánětlivých faktorů z místa transplantace migrují z lymfatických tkání. Z toho vyplývá, že jednotlivé varianty terapie mají výrazný lokální účinek na migraci CD11b pozitivních buněk do štěpu, ale v rámci systémové imunitní odpovědi není vliv léčby na migraci CD11b pozitivních buněk patrný. Procentuální zastoupení antigen prezentujících buněk jsme dále porovnávali pomocí znaků CD80, CD86 a CD11c a u všech tří populací jsme pozorovali podobný trend. V suspenzích LNC se jejich počet zvýšil u neléčených myši s transplantátem ke snížení na úroveň netransplantovaných kontrol došlo u myši léčených pomocí nanovláknenných nosičů bez CsA nebo s inkorporovaným CsA a s adherovanými MSC. V návaznosti na výsledky analýzy zastoupení CD80 pozitivních buněk v transplantátech lze vyvozovat, že vlivem různých terapií se mění migrační schopnosti CD80, CD86 a CD11c pozitivních antigen prezentujících buněk, které

pak nemigrují do lymfatických uzlin, kde by se podílely na rozvoji imunitní odpovědi, ale že jsou zadržovány v místě transplantace. Přesnější specifikace této poměrně různorodé skupiny buněk, která zahrnuje jak DC, makrofágy, tak B lymfocyty a případně další aktivované buňky zatím nebyla provedena, na základě výsledků se však nabízí možnost zaměřit další výzkum například na populaci makrofágů nebo DC.

Další významnou populaci leukocytů LNC tvoří lymfocyty. Ačkoli CD4 pozitivní T lymfocyty jsou nejvíce zastoupenou buněčnou populací v lymfatických uzlinách – tvoří přibližně 60 % buněk – nepozorovali jsme žádné výrazné změny v rámci všech skupin myší. Ani CD19, CD4CD25 a CD8 pozitivní buňky nevykazovaly významné změny v procentuálním zastoupení. Bylo prokázáno, že MSC mohou snižovat expresi časných aktivačních antigenů T lymfocytů – CD69 a CD25 (Le Blanc et al. 2004). Naše výsledky potvrzují, že po terapii využívající MSC dochází k potlačení časné aktivace T lymfocytů. MSC mohou také působit na diferenciaci dvou dalších důležitých populací lymfocytů, Treg a Th17 buněk. Řada prací se zabývá studiem diferenciacie stimulovaných T lymfocytů na Treg buňky vlivem působení MSC (např. Maccario et al. 2005, Selmani et al. 2008, Svobodová et al. 2011). My jsme u procentuálního zastoupení CD4Foxp3 pozitivních buněk v suspenzích LNC ze všech skupin myší nepozorovali žádné změny. To může být způsobeno jednak odlišnými podmínkami, jelikož většina studií byla provedena in vitro. Navíc je v uzlinách jen velmi malé procento MSC. Zajímavý je však fakt, že i toto malé procento MSC může zřejmě působit na procentuální zastoupení CD4RORγt pozitivních Th17 buněk v lymfatických uzlinách. Je možné konstatovat, že všechny varianty léčby měly za následek snížení počtu Th17 buněk v suspenzích LNC. Tyto naše výsledky korelují s poznáním, že MSC inhibují diferenciaci Th17 buněk (Rafei et al. 2009) a tím potlačují prozánětlivý charakter imunitní odpovědi na transplantaci kožního štěpu.

S využitím ELISA testu jsme v dalších pokusech sledovali vliv jednotlivých variant terapie na produkci cytokinů buňkami lymfatických uzlin. Testovali jsme jak cytokin prozánětlivý, typický pro Th1 odpověď – IFN- γ a cytokin protizánětlivý, typický pro Th2 odpověď – IL-10. Zjistili jsme, že vlivem terapie dojde ke zvýšení produkce IL-10. Tento efekt nebyl zaznamenán u nanovláken s inkorporovaným CsA, což lze přisuzovat působení CsA -selektivního imunosupresiva působícího na T lymfocyty. Zároveň ale naše výsledky ukazují, že při současné aplikaci MSC a CsA se produkce IL-10 zvýší a je dokonce mírně vyšší než u myší léčených pouze nanovláčennými nosiči s adherovanými MSC. Znovu jsme tak potvrdili, že terapie založená na využití MSC a CsA je účinnější než podání samotných MSC nebo CsA. Takiishi et al. (2012) na myším modelu ukázali, že pro přežívání kožního

transplantátu je důležitá produkce IL-10 epiteliálními buňkami dárce. Je tedy možné, že námi pozorovaná zvýšená produkce IL-10 LNC se může podílet na prodloužení přežívání transplantátu. Je známo, že MSC ovlivňují rovnováhu mezi Th1 a Th2 imunitní odpovědi (Aggarwal and Pittenger 2005). I nám se podařilo tuto skutečnost potvrdit. Tím, že MSC podporují funkce Th2 lymfocytů, se zvyšuje produkce IL-10. Tento cytokin působí hlavně na antigen prezentující buňky, u nichž snižuje aktivaci a expresi kostimulačních a MHC molekul. Naše výsledky získané pomocí ELISA testu korelují s výsledky FACS analýzy, kdy jsme v suspenzích LNC pozorovali snížení počtu CD80, CD86 a CD11c pozitivních antigen prezentujících buněk – toto snížení je možné vysvětlit nejen změnou migračních schopností buněk, ale také sníženou expresí kostimulačních molekul. Prostřednictvím inhibice funkcí antigen prezentujících buněk má IL-10 také negativní vliv na aktivaci a funkce Th1 lymfocytů, které pak produkují méně IFN- γ . Toto snížení produkce IFN- γ jsme pozorovali v kulturách LNC z myši léčených pomocí nanovlákných nosičů bez CsA nebo s inkorporovaným CsA a s adherovanými MSC. Hlavní funkcí IFN- γ je aktivace makrofágů, rozhodli jsme se tedy přítomnost tohoto cytokinu v kultuře potvrdit pomocí další, nepřímé metody zaměřené právě na aktivované makrofágy a jejich produkci NO po aktivaci prozánětlivými faktory z MLC. Získané výsledky korelují s naměřenou produkcí IFN- γ .

Interpretace výsledků získaných pomocí in vivo modelu je sice náročná, protože se jedná o otevřený systém, kde se může uplatňovat mnoho faktorů a zatím neznámých interakcí, na druhou stranu nám právě tento model umožnil studovat situaci komplexně. Důležitým poznáním je, že po transplantaci kožního štěpu je ovlivněna jak lokální, tak systémová imunitní odpověď a že je možno tuto reakci regulovat podáním nanovlákných nosičů bez CsA nebo s inkorporovaným CsA a s adherovanými MSC. Zajímavým fenoménem je také fakt, že už samotná léčba pomocí nanovlákných nosičů má pozitivní vliv na morfologii kožních štěpů i na relativní buněčná zastoupení některých populací leukocytů v transplantátu, přičemž u systémové imunitní odpovědi je tento efekt méně patrný. Aplikace nanovláken na transplantovanou tkáň zřejmě napomáhá tvorbě příznivějšího mikroprostředí a zabraňuje vysušování tkáně. Z výsledků lze dále vyvodit, že zatímco u lokální imunitní odpovědi hrají jednu z hlavních rolí makrofágy a inhibiční efekt podaných MSC je pozorovatelný především prostřednictvím molekul produkovaných makrofágy, u systémové imunitní odpovědi můžeme imunoregulační efekt MSC pozorovat na změnách v zastoupení antigen prezentujících buněk a funkčnosti T lymfocytů. Tato data potvrzují, jak složité jsou vztahy mezi jednotlivými buněčnými populacemi leukocytů v rámci imunity lokální a systémové a že MSC mohou do

této regulace vstupovat a tím měnit charakter probíhající imunitní odpovědi. Z toho vyplývá důležitost dalšího výzkumu interakcí a působení MSC společně se zhodnocením vhodného podávání a případně zavedení další podpůrné imunosupresivní léčby.

8 Závěr

- Nanovláknenné nosiče nemají toxický vliv na metabolickou aktivitu MSC ani na jejich produkci IL-6 a NO.
- Určité procento podaných MSC zůstává v místě aplikace, část migruje do lymfatických tkání. Tyto po šesti dnech je možné buňky detekovat jak pomocí FACS analýzy a histologických řezů.
- Podání nanovláknenných nosičů s MSC na kožní štěp má příznivý efekt na potlačení zánětlivé a odhojovací reakce. Tento efekt je nejvíce patrný od čtvrtého do osmého dne od transplantace. Projevuje se na morfologii kožního transplantátu, na relativním buněčném zastoupení leukocytů, jejich aktivaci a produkci molekul leukocyty v kožním štěpu i v lymfatických tkáních.
- MSC ovlivňují jak lokální, tak systémovou imunitní odpověď.
- Významnou roli při odhojovací reakci hrají monocyty a makrofágy. V transplantované kožní tkáni tvoří nejpočetnější populaci leukocytů, přičemž jejich počet se vlivem jednotlivých terapií zmenšuje. Podobný trend je možné pozorovat i u dalších molekul spojených s makrofágy a jejich aktivací. Jedná se o NO produkovaný makrofágy v kožním transplantátu a expresi genů pro iNOS a IL-1. Tento efekt není způsoben toxickým vlivem nanovláknenných nosičů na makrofágy.
- Transplantace a následná léčba mají vliv na relativní buněčná zastoupení a funkci subpopulací T lymfocytů v tkáni lymfatických uzlin.

9 Použitá literatura

- Aggarwal S, Pittenger MF. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105(4):1815-1822.
- Aksu AE, Horibe E, Sacks J, Ikeguchi R, Breiting J, Scozio M, Unadkat J, Feili-Hariri M. 2008. Co-infusion of donor bone marrow with host mesenchymal stem cells treats GVHD and promotes vascularized skin allograft survival in rats. *Clinical Immunology* 127(3):348-358.
- Almeida-Porada G, Porada CD, Tran N, Zanjani ED. 2000. Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood* 95(11):3620-3627.
- Asari S, Itakura S, Ferreri K, Liu CP, Kuroda Y, Kandeel F, Mullen Y. 2009. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Experimental Hematology* 37(5):604-615.
- Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Ucelli A. 2002. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology* 30(1):42-48.
- Billingham RE, Brent L, Medawar PB, Sparrow EM. 1954. Quantitative studies on tissue transplantation immunity.1. The survival times of skin homografts exchanged between inbred strains of mice. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 143(910):43-58.
- Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98(8):2396-2402.
- Caplan AI. 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* 9(5):641-650.
- Chamberlain G, Wright K, Rot A, Ashton B, Middleton J. 2008. Murine mesenchymal stem cells exhibit a restricted repertoire of functional chemokine receptors: comparison with human. *Plos One* 3(8): 1-6
- Chew SY, Wen Y, Dzenis Y, Leong KW. 2006. The role of electrospinning in the emerging field of nanomedicine. *Current Pharmaceutical Design* 12(36):4751-4770.
- Chiesa S, Morbelli S, Morando S, Massollo M, Marini C, Bertoni A, Frassoni F, Bartolome ST, Sambuceti G, Traggiai E and others. 2011. Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(42):17384-17389.
- Chong EJ, Phan TT, Lim IJ, Zhang YZ, Bay BH, Ramakrishna S, Lim CT. 2007. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta Biomaterialia* 3(3):321-330.
- Cohnheim J. 1867. Ueber entzündung und eiterung. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin* 40: 1-79
- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Ucelli A. 2006. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107(1):367-372.
- De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and Rheumatism* 44(8):1928-1942.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99(10):3838-3843.

- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy* 8(4):315-317.
- Dominici M, Paolucci P, Conte P, Horwitz EM. 2009. Heterogeneity of multipotent mesenchymal stromal cells: From Stromal Cells to Stem Cells and Vice Versa. *Transplantation* 87(9):S36-S42.
- Dubsky M, Kubinova S, Sirc J, Voska L, Zajicek R, Zajicova A, Lesny P, Jirkovska A, Michalek J, Munzarova M and others. 2012. Nanofibers prepared by needleless electrospinning technology as scaffolds for wound healing. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 23(4):931-941.
- English K, Mahon BP. 2011. Allogeneic mesenchymal stem cells: Agents of immune modulation. *Journal of Cellular Biochemistry* 112(8):1963-1968.
- Friedenstein AJ, Piatetzki II, Petrakov KV. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 16:381-&.
- Ghannam S, Pene J, Torcy-Moquet G, Jorgensen C, Yssel H. 2010. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *Journal of Immunology* 185(1):302-312.
- Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EWF, Dazzi F. 2005. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 105(7):2821-2827.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(25):13625-13630.
- Gronthos S, Zannettino ACW, Hay SJ, Shi ST, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. 2003. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *Journal of Cell Science* 116(9):1827-1835.
- Guo ZX, Zheng CL, Chen ZP, Gu DS, Du WT, Ge J, Han ZC, Yang RC. 2009. Fetal BM-derived mesenchymal stem cells promote the expansion of human Th17 cells, but inhibit the production of Th1 cells. *European Journal of Immunology* 39(10):2840-2849.
- Holan V, Chudickova M, Trosan P, Svobodova E, Krulova M, Kubinova S, Sykova E, Sirc J, Michalek J, Juklickova M, Munzarova M, Zajicova A. 2011. Cyclosporine A-loaded and stem cell-seeded electrospun nanofibers for cell-based therapy and local immunosuppression. *Journal of Controlled Release* 156(3):406-412.
- Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WWK, Fitzpatrick LA, Neel MD, McCarville ME, Orchard PJ, Pyeritz RE, Brenner MK. 2001. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* 97(5):1227-1231.
- Imberti B, Morigi M, Tomasoni S, Rota C, Corna D, Longaretti L, Rottoli D, Valsecchi F, Benigni A, Wang J, Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. 2007. Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell-mediated renal repair. *Journal of the American Society of Nephrology* 18(11):2921-2928.
- van't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings G, Claas FHJ, Fibbe WE, Kanhai HHH. 2004. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 22(7):1338-1345.
- Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105(10):4120-4126.
- Jin GR, Prabhakaran MP, Ramakrishna S. 2011. Stem cell differentiation to epidermal lineages on electrospun nanofibrous substrates for skin tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 7(8):3113-3122.

- Jones E, McGonagle D. 2008. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology* 47(2):126-131.
- Kassis I, Grigoriadis N, Gowda-Kurkalli B, Mizrahi-Kol R, Ben-Hur T, Slavin S, Abramsky O, Karussis D. 2008. Neuroprotection and immunomodulation with mesenchymal stem cells in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Archives of Neurology* 65(6):753-761.
- Kavanagh H, Mahon BP. 2011. Allogeneic mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation by inducing murine regulatory T cells. *Allergy* 66(4):523-531.
- Kim J, Hematti P. 2009. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology* 37(12):1445-1453.
- Kim SS, Song CK, Shon SK, Lee KY, Kim CH, Lee MJ, Wang L. 2009. Effects of human amniotic membrane grafts combined with marrow mesenchymal stem cells on healing of full-thickness skin defects in rabbits. *Cell and Tissue Research* 336(1):59-66.
- Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. 2006. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24(2):386-398.
- Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. 2003. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 101(9):3722-3729.
- Kumbar SG, James R, Nukavarapu SP, Laurencin CT. 2008. Electrospun nanofiber scaffolds: engineering soft tissues. *Biomedical Materials* 3(3).
- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O. 2004. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363(9419):1439-1441.
- Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. 2003. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scandinavian Journal of Immunology* 57(1):11-20.
- Liu H, Lu K, MacAry PA, Wong KL, Heng A, Cao T, Kemeny DM. 2012. Soluble molecules are key in maintaining the immunomodulatory activity of murine mesenchymal stromal cells. *Journal of Cell Science* 125(1):200-208.
- Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatici A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F. 2005. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4(+), T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica-the Hematology Journal* 90(4):516-525.
- Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzon IM, Nepomnaschy I, Costa H, Canones C, Raiden S, Vermeulen M, Geffner JR. 2010. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *Plos One* 5(2).
- Mao F, Xu WR, Qian H, Zhu W, Yan YM, Shao QX, Xu HX. 2010. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells in collagen-induced mouse arthritis. *Inflammation Research* 59(3):219-225.
- Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, Kato S, Ito M, Hotta T, Ando K. 2006. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood* 107(5):1878-1887.
- Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. 2000. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of Cell Science* 113(7):1161-1166.

- Nur-E-Kamal A, Ahmed I, Kamal J, Schindler M, Meiners S. 2006. Three-dimensional nanofibrillar surfaces promote self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 24(2):426-433.
- Ohtaki H, Ylostalo JH, Foraker JE, Robinson AP, Reger RL, Shioda S, Prockop DJ. 2008. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(38):14638-14643.
- Ortiz LA, DuTreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, Phinney DG. 2007. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(26):11002-11007.
- Ozawa T, Mickle DAG, Weisel RD, Koyama N, Ozawa S, Li RK. 2002. Optimal biomaterial for creation of autologous cardiac grafts. *Circulation* 106(13):I176-I182.
- Pallier A, Hillion S, Danger R, Giral M, Racape M, Degauque N, Dugast E, Ashton-Chess J, Pettre S, Lozano JJ, Bataille R, Devys A, Cesbron-Gautier A, Braudeau C, Larrose C, Soulillou JP, Brouard S. 2010. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney International* 78(5):503-513.
- Papadaki HA, Tsagournisakis M, Mastorodemos V, Pontikoglou C, Damianaki A, Pyrovolaki K, Stamatopoulos K, Fassas A, Plaitakis A, Eliopoulos GD. 2005. Normal bone marrow hematopoietic stem cell reserves and normal stromal cell function support the use of autologous stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplantation* 36(12):1053-1063.
- Rafei M, Campeau PA, Aguilar-Mahecha A, Buchanan M, Williams P, Birman E, Yuan S, Young YK, Boivin MN, Forner K, Basik M, Galipeau J. 2009. Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner. *Journal of Immunology* 182(10):5994-6002.
- Rafei M, Hsieh J, Fortier S, Li MY, Yuan S, Birman E, Forner K, Boivin MN, Doody K, Tremblay M, Annabi B, Galipeau J. 2008. Mesenchymal stromal cell-derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. *Blood* 112(13):4991-4998.
- Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, Ottonello L, Pistoia V. 2008. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: A model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* 26(1):151-162.
- Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EWF, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. 2007a. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* 83(1):71-76.
- Ramasamy R, Lam EWF, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D, Dazzi F. 2007b. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia* 21(2):304-310.
- Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. 2003. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 76(8):1208-1213.
- Reading L, Still K, Bishop N, Scutt A. 2000. Peripheral blood as an alternative source of mesenchymal stem cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 15(6):1239-1239.
- Ren GW, Zhang LY, Zhao X, Xu GW, Zhang YY, Roberts AI, Zhao RC, Shi YF. 2008. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2(2):141-150.

- Reneker DH, Chun I. 1996. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* 7(3):216-223.
- Rim NG, Lee JH, Jeong SI, Lee BK, Kim CH, Shin H. 2009. Modulation of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by poly (L-lactide)-co-(epsilon-caprolactone) /gelatin nanofibers. *Macromolecular Bioscience* 9(8):795-804.
- Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, Buravkova LB. 2005. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: Isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 140(1):138-143.
- Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ, Bistran R, Muller S, Seifried E, Gille J, Henschler R. 2006. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* 108(12):3938-3944.
- Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. 2008. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *Journal of Immunology* 180(4):2581-2587.
- Sbano P, Cuccia A, Mazzanti B, Urbani S, Giusti B, Lapini I, Rossi L, Abbate R, Marseglia G, Nannetti G, Torricelli F, Miracco C, Bosi A, Fimiani M, Saccardi R. 2008. Use of donor bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of skin allograft rejection in a preclinical rat model. *Archives of Dermatological Research* 300(3):115-124.
- Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. 2008. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4(+)CD25(high)FOXP3(+) regulatory T cells. *Stem Cells* 26(1):212-222.
- Sheridan RL, Tompkins RG. 1999. Skin substitutes in burns. *Burns* 25(2):97-103.
- Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, Wysoczynski M, Turner AR, Ratajczak J, Ratajczak MZ, Janowska-Wieczorek A. 2006. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells* 24(5):1254-1264.
- Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevas CN, Papamichail M. 2006. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 24(1):74-85.
- Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. 2006. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 107(4):1484-1490.
- Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N, Galipeau J. 2006. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood* 107(6):2570-2577.
- Svobodova E, Krulova M, Zajicova A, Pokorna K, Prochazkova J, Trosan P, Holan V. 2012. The role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naive T-cells into anti-inflammatory regulatory T-cell or proinflammatory helper T-Cell 17 population. *Stem Cells and Development* 21(6):901-910.
- Takiishi T, Tadokoro CE, Rizzo LV, de Moraes LV. 2012. Early IL-10 production is essential for syngeneic graft acceptance. *Journal of Leukocyte Biology* 92(2):259-64.
- Tu ZD, Li Q, Bu H, Lin F. 2010. Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor H. *Stem Cells and Development* 19(11):1803-1809.
- Uemura R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M. 2006. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circulation Research* 98(11):1414-1421.
- Urban VS, Kiss J, Kovacs J, Gocza E, Vas V, Monostori E, Uher F. 2008. Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells* 26(1):244-253.

- Wan CD, Cheng R, Wang HB, Liu T. 2008. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* 7(1):29-33.
- Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. 2010. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *Plos One* 5(4).
- Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG. 1999. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *American Surgeon* 65(1):22-26.
- Wu GD, Nolta JA, Jin YS, Barr ML, Yu H, Starnes VA, Cramer DV. 2003. Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. *Transplantation* 75(5):679-685.
- Xia X, Ji T, Chen PB, Li X, Fang Y, Gao QL, Liao SJ, You LY, Xu HB, Ma QF, Wu P, Hu WC, Wu MF, Cao L, Li KZ, Weng YJ, Han ZQ, Wei JC, Liu RH, Wang SX, Xu G, Wang DW, Zhou JF, Ma D. 2011. Mesenchymal stem cells as carriers and amplifiers in CRAd delivery to tumors. *Molecular Cancer* 10.
- Xu J, Lu YH, Ding F, Zhan X, Zhu MY, Wang ZW. 2007. Reversal of diabetes in mice by intrahepatic injection of bone-derived GFP-murine mesenchymal stem cells infected with the recombinant retrovirus-carrying human insulin gene. *World Journal of Surgery* 31(9):1872-1882.
- Xu XL, Chen XS, Ma PA, Wang XR, Jing XB. 2008. The release behavior of doxorubicin hydrochloride from medicated fibers prepared by emulsion-electrospinning. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 70(1):165-170.
- You S, Kublin CL, Avidan O, Miyasaki D, Zoukhri D. 2011. Isolation and propagation of mesenchymal stem cells from the lacrimal gland. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52(5):2087-2094.
- Zajicova A, Pokorna K, Lencova A, Krulova M, Svobodova E, Kubinova S, Sykova E, Pradny M, Michalek J, Svobodova J, Munzarova M, Holan V. 2010. Treatment of ocular surface injuries by limbal and mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds. *Cell Transplantation* 19(10):1281-1290.
- Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A. 2005. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 106(5):1755-1761.
- Zeng J, Chen XS, Xu XY, Liang QZ, Bian XC, Yang LX, Jing XB. 2003. Ultrafine fibers electrospun from biodegradable polymers. *Journal of Applied Polymer Science* 89(4):1085-1092.
- Zhang W, Qin C, Zhou ZM. 2007. Mesenchymal stem cells modulate immune responses combined with cyclosporine in a rat renal transplantation model. *Transplantation Proceedings* 39(10):3404-3408.
- Zhao G, Moore DJ, Lee KM, Kim JI, Duff PE, O'Connor MR, Hirohashi T, Lei J, Yang M, Markmann JF, Deng S. 2010. An unexpected counter-regulatory role of IL-10 in B-lymphocyte-mediated transplantation tolerance. *American Journal of Transplantation* 10(4):796-801.
- Zhou L, Lopes JE, Chong MMW, Ivanov, II, Min R, Victora GD, Shen YL, Du JG, Rubtsov YP, Rudensky AY, Ziegler SF, Littman DR. 2008. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR gamma t function. *Nature* 453(7192):236-U14.